



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Tadeu
De Oliveira Diz

Tesis doctoral

Efectos metabólicos de la
inhibición de p107 hepático en
la comunicación de hígado y
tejido adiposo

Santiago de Compostela, 2025

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DOCTORAL

**Efectos metabólicos de la inhibición de p107
hepático en la comunicación de hígado y tejido
adiposo**

Autor

Tadeu De Oliveira Diz

Directores: Sulay Tovar Carro

Carlos Diéguez González

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2025

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Tadeu De Oliveira Diz

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral titulada:

**EFFECTOS METABÓLICOS DE LA INHIBICIÓN DE P107 HEPÁTICO EN LA COMUNICACIÓN DE
HÍGADO Y TEJIDO ADIPOSO**

RESUMEN

La obesidad, cuyo incremento se ha multiplicado en la última década, y sus comorbilidades como diabetes tipo II son los principales factores asociados a la enfermedad del hígado graso por disfunción metabólica (MASLD). En la búsqueda de nuevos candidatos para un tratamiento frente a estas patologías han surgido los reguladores de ciclo celular, y entre ellos, objeto de nuestro interés, p107. p107 es una proteína perteneciente a la familia de las “*pocket proteins*” junto con Rb y p130, y que ha demostrado tener un papel importante en el balance energético. Además, estudios realizados por nuestro grupo, ya publicados, describieron como los ratones p107 KO mostraban resistencia a la obesidad inducida por dieta debido a un aumento del gasto energético como consecuencia de un incremento de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (TAM) y amarronamiento del tejido adiposo blanco (TAB), indicando su relevancia como modulador de la actividad metabólica tanto de los adipocitos marrones como de los blancos.

En la presente tesis doctoral se intenta explorar las acciones de p107 sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa tanto en el hígado como en el tejido adiposo. Por otra parte, se intentará discernir su influencia en la comunicación entre estos dos tejidos y los consecuentes efectos en el desarrollo de la obesidad y de la enfermedad hepática.

Para ello, utilizamos ratones *knockouts* de p107 y ratones con “*downregulation*” específica en el hígado. A estos animales se les indujo obesidad y esteatosis hepática mediante dietas altas en grasa (HFD) o dietas altas en grasa y deficientes en colina (CDHFD).

Nuestros resultados han demostrado que, en concordancia con los modelos de obesidad, la inhibición de p107 produce una resistencia a la esteatosis inducida por dieta actuando sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa. Por otra parte, la inhibición específica en el hígado, si bien ejerce acciones sobre el tejido adiposo, en conjunto produce efectos fenotípicos más discretos.

En conclusión, este trabajo muestra un nuevo papel de p107 en metabolismo tanto a nivel hepático como en la comunicación del hígado con el tejido adiposo blanco siendo un potencial candidato como nueva diana terapéutica para retrasar el MASLD y la progresión de la enfermedad hepática.

ABSTRACT

Obesity, which has increased in the last decade, and its comorbidities such as type II diabetes are the main factors associated with metabolic dysfunction fatty liver disease (MASLD). In the search for new candidates for treatment of these pathologies, cell cycle regulators have emerged, and among them, the object of our interest, p107. p107 is a protein belonging to the family of “pocket proteins” together with Rb and p130, and has been shown to play an important role in energy balance. In addition, studies carried out by our group, already published, described how p107 KO mice showed resistance to diet-induced obesity due to an increase in energy expenditure as a consequence of an increase in thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) and browning of white adipose tissue (WAT), indicating its relevance as a modulator of metabolic activity in both brown and white adipocytes. In this doctoral thesis we attempt to explore the actions of p107 on lipid and glucose metabolism in both the liver and adipose tissue. Furthermore, we will attempt to discern its influence on the communication between these two tissues and the consequent effects on the development of obesity and liver disease.

To this end, we used p107 knockout mice and mice with specific “downregulation” in the liver. These animals were induced to develop obesity and hepatic steatosis using high-fat diets (HFD) or high-fat choline-deficient diets (CDHFD).

Our results have shown that, in agreement with obesity models, p107 inhibition produces resistance to diet-induced steatosis by acting on lipid and glucose metabolism. On the other hand, specific inhibition in the liver, although it exerts actions on adipose tissue, overall produces more discrete phenotypic effects.

In conclusion, this work shows a new role of p107 in metabolism both at the hepatic level and in the communication of the liver with white adipose tissue, being a potential candidate as a new therapeutic target to delay MASLD and the progression of liver disease.

RESUMO

A obesidade, que aumentou na última década, e as súas comorbilidades como a diabetes tipo II son os principais factores asociados á enfermidade do fígado graso por disfunción metabólica (MASLD). Na procura de novos candidatos para o tratamento destas patoloxías, xurdiron os reguladores do ciclo celular, e entre eles, o obxecto do noso interese, p107. A p107 é unha proteína pertencente á familia das "proteínas de peto" xunto con Rb e p130, e demostrouse que desempeña un papel importante no equilibrio enerxético. Ademais, estudos realizados polo noso grupo, xa publicados, describían como os ratos p107 KO mostraban resistencia á obesidade inducida pola dieta debido ao aumento do gasto enerxético como consecuencia dun aumento da termoxénese no tecido adiposo pardo e do tecido adiposo marrón (TAM). Tecido adiposo branco (TAB), que indica a súa relevancia como modulador da actividade metabólica tanto en adipocitos marróns como brancos. Nesta tese de doutoramento intentamos explorar as accións da p107 sobre o metabolismo dos lípidos e da glicosa tanto no fígado como no tecido adiposo. Ademais, tentárase discernir a súa influencia na comunicación entre estes dous tecidos e os consecuentes efectos no desenvolvemento da obesidade e da enfermidade hepática.

Para iso, utilizamos ratos knockout p107 e ratos con "regulación negativa" específica no fígado. Estes animais foron inducidos a desenvolver obesidade e esteatose hepática mediante dietas ricas en graxas (HFD) ou dietas ricas en graxas deficientes en colina (CDHFD).

Os nosos resultados demostraron que, de acordo cos modelos de obesidade, a inhibición de p107 produce resistencia á esteatose inducida pola dieta ao actuar sobre o metabolismo dos lípidos e da glicosa. Por outra banda, a inhibición específica no fígado, aínda que exerce accións sobre o tecido adiposo, en xeral produce efectos fenotípicos máis discretos.

En conclusión, este traballo mostra un novo papel da p107 no metabolismo tanto a nivel hepático como na comunicación do fígado co tecido adiposo branco, sendo un potencial candidato como nova diana terapéutica para atrasar a MASLD e a progresión da enfermidade hepática.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS.....	16
INTRODUCCIÓN.....	22
1. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	23
1.1 EN LÍNEAS GENERALES.....	23
2. EL HÍGADO.....	26
2.1 HOMEOSTASIS LIPÍDICA EN EL HÍGADO.....	26
2.1.1 Captación de lípidos circulantes.....	26
2.1.2 Lipogénesis <i>de novo</i> hepática.....	27
2.1.3 Oxidación hepática de los ácidos grasos.....	29
2.2 PAPEL DEL HÍGADO EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	30
2.2.1 Captación, síntesis de glucógeno y gluconeogénesis.....	30
2.2.2 Glucólisis.....	32
2.2.3 El ciclo del ácido cítrico en los hepatocitos.....	33
3. DESEQUILIBRIO DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	33
3.1 LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO.....	34
3.2 HÍGADO GRASO ASOCIADO A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MASLD).....	35
3.2.1 Definición, epidemiología y patogénesis.....	35
3.2.2 Diagnóstico y tratamiento terapéutico.....	37
3.3 ALTERACIONES METABÓLICAS EN LA PROGRESIÓN DE MASLD.....	38
3.3.1 Resistencia a la insulina.....	38
3.3.2 Estrés del retículo endoplasmático.....	38
3.3.3 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.....	39
3.3.4 Lipotoxicidad.....	40
3.3.5 Inflamación hepática.....	41
3.3.6 Apoptosis y necrosis.....	42
3.3.7 Fibrosis.....	43
4. EL TEJIDO ADIPOSO.....	43
4.1 TEJIDO ADIPOSO BLANCO.....	44
4.1.1 Metabolismo lipídico en el adipocito.....	44
4.1.2 Metabolismo de la glucosa en el adipocito.....	46
4.2 TEJIDO ADIPOSO BEIGE.....	47

4.3 TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....	48
5. INTERCOMUNICACIÓN ENTRE HÍGADO Y TEJIDO ADIPOSO.....	49
5.1 LA INTERCOMUNICACIÓN EN UN ESTADO FISIOLÓGICO.....	50
5.1.1 Metabolismo de lípidos.....	50
5.1.2 Metabolismo de la glucosa.....	51
5.2 LA INTERCOMUNICACIÓN EN UN ESTADO PATOLÓGICO.....	52
5.2.1 Metabolismo de lípidos.....	52
5.2.2 Metabolismo de la glucosa.....	54
6. p107 Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO.....	55
6.1 LA FAMILIA DE LAS POCKET PROTEIN Y EL CICLO CELULAR.....	55
6.2 FUNCIONES DE p107.....	56
6.2.1 p107 y su papel en el ciclo celular.....	56
6.2.2 p107 y el desarrollo celular.....	57
6.2.3 p107 y el metabolismo celular.....	58
HIPÓTESIS.....	62
OBJETIVOS.....	65
MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
1. EXPERIMENTACIÓN IN VIVO.....	69
1.1 ANIMALES, ESTABULACIÓN Y DIETAS.....	69
1.2 MONITORIZACIÓN DEL PESO CORPORAL, INGESTA Y COMPOSICIÓN CORPORAL.....	70
1.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL.....	71
1.4 INYECCIÓN EN LA VENA DE LA COLA.....	71
1.5 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL (IP) Y SUSTANCIAS INYECTADAS.....	72
1.6 TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT), A LA INSULINA (ITT) Y AL PIRUVATO (PTT).....	72
1.7 EUTANASIA, RECOGIDA DE TEJIDOS Y MUESTRAS.....	72
2. DISEÑOS EXPERIMENTALES EN RATONES.....	73
2.1 ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS RATONES P107 KNOCKOUTS.....	73
2.2 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE HÍGADO DE p107 DURANTE 20 SEMANAS EN RATONES C57BL6 EXPUESTOS A DIETA CDHFD.....	73
2.3 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE HÍGADO DE p107 DURANTE 11 SEMANAS EN RATONES C57BL6 EXPUESTOS A DIETA HFD.....	74

3. GENOTIPADO DE RATONES.....	75
3.1 GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS.....	75
3.1.1 Extracción de ADN a partir de un fragmento de cola.....	75
3.1.2 Amplificación mediante PCR convencional.....	75
3.1.3 Electroforesis de agarosa.....	76
4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	77
4.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE TEJIDOS.....	77
4.1.1 Hematoxilina y eosina.....	77
4.1.2 Oil Red O.....	78
4.1.3 Sirius Red.....	78
4.2 DETECCIÓN DE METABOLISMO EN TEJIDO.....	78
4.2.1 Extracción de grasa hepática.....	78
4.2.2 Determinación de colesterol y triglicéridos en muestras de grasa hepática.....	78
4.2.3 Determinación de colesterol y triglicéridos en muestras de plasma y suero.....	79
4.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	79
4.3.1 Extracción de proteínas.....	79
4.3.2 Cuantificación de proteínas.....	79
4.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE.....	80
4.3.4 Electroforesis SDS-PAGE.....	80
4.3.5 Transferencia semi-húmeda.....	81
4.3.6 Inmunodetección.....	82
4.4 PCR A TIEMPO REAL.....	84
4.4.1 Extracción de ARN.....	84
4.4.2 Cuantificación del ARN.....	85
4.4.3 Retrotranscripción.....	85
4.4.4 PCR en tiempo real.....	85
5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	86
RESULTADOS.....	89
1. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN GLOBAL DE P107 SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN UN MODELO DE MASLD INDUCIDO POR CDHFD.....	90
1.1 RATONES p107 KNOCKOUTS PRESENTAN UN FENOTIPO DELGADO EN CONDICIONES DE CDHFD.....	90

1.2 RATONES p107 KO PRESENTAN UNA RESISTENCIA A LA ESTEATOSIS Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO.....	94
1.3 RATONES p107KO CON CDHFD PRESENTAN CAMBIOS EN PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA EN EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO.....	96
2. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE p107 EN HÍGADO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO EN UN MODELO DE ESTEATOSIS INDUCIDO POR HFD.....	101
2.1 LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES OBESOS NO AFECTA EL PESO CORPORAL, SIN EMBARGO DISMINUYE LOS NIVELES DE GLUCOSA PLASMÁTICA....	101
2.2 LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA PRODUCE UNA RESISTENCIA A LA ESTEATOSIS Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO.....	103
2.3 LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES CON HFD PRODUCE CAMBIOS EN PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA EN EL TEJIDO ADIPOSEO.....	105
3. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE p107 EN HÍGADO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO EN UN MODELO DE MASLD INDUCIDO POR CDHFD.....	110
3.1 LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CDHFD DEMUESTRA UNA MEJOR SENSIBILIDAD A LA INSULINA.....	110
3.2 LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CDHFD DISMINUYE EL ACÚMULO LIPÍDICO Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO.....	112
3.3 ACCIONES DE LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CDHFD EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA EN TABep y TABsc.....	114
DISCUSIÓN.....	120
CONCLUSIÓN.....	129
BIBLIOGRAFÍA.....	132
ANEXOS.....	145

ABREVIATURAS ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

ACC: acetil-CoA carboxilasa (acrónimo del inglés: acetyl-CoA carboxilase). ***El gen se describe con las siglas: acaca***

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AG: ácido graso

AgRP: péptido relacionado con agutí (acrónimo del inglés: agouti-related peptide)

AKT: protein kinasa B-PKB

AMPK: quinasa activada por adenosina monofosfato (acrónimo del inglés: adenosine monophosphateactivated kinase)

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNsh: ácido ribonucleico de horquilla corta (acrónimo del inglés: short hairpin)

ATF6: FT activante 6 (acrónimo del inglés: activating transcription factor 6)

ATP: trifosfato de adenosina (acrónimo del inglés: adenosine triphosphate)

AUC: área bajo la curva (acrónimo del inglés: area under the curve)

BSA: albúmina sérica bobina

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico

CDHFD: dieta deficiente en colina y alta en grasa

CDK: quinasas dependientes de ciclinas (cyclin-dependent kinase)

CD36: cluster of differentiation 36

ChREBP: proteína de unión en respuesta a carbohidratos (acrónimo del inglés: carbohydrateresponsive). ***El gen se describe con las siglas: mxipl***

CO₂: dióxido de carbono

CoA: coenzima A

CPT (1 α y 2): carnitina palmitoiltransferasa

CRE: elementos de respuesta ATF/cAMP (acrónimo del inglés: cAMP-response element)

CREB: elemento de unión en respuesta a AMPc (acrónimo del inglés: cAMP response elementbinding)

CYP: citocromo P450

DAG: diacilgliceridos

DEPC: dietilpirocarbonato

DGAT: diglicérido aciltransferasa

DIO: obesidad inducida por la dieta (acrónimo del inglés: diet induced obesity)

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DMSO: dimetilsulfóxido

DNL: en inglés *De novo lipogenesis*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (acrónimo del inglés: ethylene-diamine-tetraacetic acid)

EMEM: medio de cultivo celular (acrónimo del inglés: Minimum Essential Medium Eagle)

FADH: dinucleótido de flavina y adenina (acrónimo del inglés: flavin adenine dinucleotide)

FAS: ácido graso sintetasa (acrónimo del inglés: fatty acid synthase). ***El gen se describe con las siglas: Fasn***

FATP: proteína de transporte de ácidos grasos

FBS: suero bovino fetal (acrónimo del inglés: fetal bovine serum)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FGF21: factor de crecimiento fibroblástico 21 (acrónimo del inglés: fibroblast growth factor 21)

FoxO1: factor de transcripción (acrónimo del inglés: Forkhead box O1)

FXR: receptor X fernesioide

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G6PC: glucosa-6-fosfato
GCK: glucoquinasa
GK: glucoquinasa
GLP-1: péptido 1 similar al glucagón (acrónimo del inglés: glucagón-like peptide 1)
GLUT (1, 2 o 4): transportador de glucosa (tipo 1, 2 o 4) (acrónimo del inglés: glucose transporter). ***El gen se describe con las siglas: Slc2a2***
GTT: test de tolerancia a glucosa
h: hora/s
HDAC: Histona desacetilasa
HDL: lipoproteínas de alta densidad (acrónimo del inglés: high density lipoprotein)
HFD: dieta alta en grasa
Hit: golpe, en relación a las etapas del desarrollo de NAFLD
HSL: lipasa sensible a hormonas (acrónimo del inglés: hormone-sensitive lipase)
IL: interleuquina
IMC: índice de masa corporal
IP: intraperitoneal
IRE1: *inositol requiring enzyme 1 alpha*
ITT: test de tolerancia a insulina
JNK: kinasa N-terminal de c-Jun
KO: Acrónimo del inglés: *knock out*
LDL: lipoproteínas de baja densidad (acrónimo del inglés: low density lipoprotein)
LDN: lipogénesis *de novo*
LXR: receptor nuclear hepático X (acrónimo del inglés: liver X receptor). ***El gen se describe con las siglas: Nr1h2***
MASLD: enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (acrónimo del inglés: Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease)
MG: monoacilglicéridos
MRI: resonancia magnética por imagen
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero (acrónimo del inglés: mammalian target of rapamycin)
Mttp: proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (acrónimo del inglés: microsomal triglyceride transfer)
Myf5: factor miogénico 5 (acrónimo del inglés: myogenic factor 5)
NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina (acrónimo del inglés: nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAFL: esteatosis no alcohólica
NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico
NCoR: correpresor 1 de receptor nuclear
NE: norepinefrina
NEFAs: ácidos grasos libres (acrónimo del inglés: non-esterified fatty acids)
NLRX1: Miembro de la familia NLR X1
O2: oxígeno
OMS: organización mundial de la salud
PBS: solución salina tamponada con fosfato (acrónimo del inglés: phosphate buffered saline)
PC: piruvato carboxilasa
PCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (acrónimo del inglés: phosphoenolpyruvate)

carboxykinase). ***El gen se describe con las siglas: pck***

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (acrónimo del inglés: polymerase chain reaction)

PDH: piruvato deshidrogenasa (acrónimo del inglés: pyruvate deshidrogenase)

PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa (acrónimo del inglés: pyruvate deshidrogenase kinase)

PERK: *PKR-like ER kinase*

PFK: fosfofructoquinasa

PGC1: coactivador de PPAR γ 1 (acrónimo del inglés: PPAR γ coactivator 1)

PI3K: fosfoinositol 3 quinasa (acrónimo del inglés: phosphoinositide 3-kinase)

PK: piruvato quinasa (acrónimo del inglés: pyruvate kinase)

PKA: proteína quinasa A (protein kinase A)

PKC: proteína quinasa C (protein kinase C)

PKM2: Isoenzimas M1/M2 de la piruvato quinasa

PPAR (α y γ): receptor activado del proliferador del peroxisoma (acrónimo del inglés:

peroxisome proliferator activated receptor)

Prdm16: dominio Pr 16 (acrónimo del inglés: Pr domain zinc finger 16)

PTT: test de tolerancia al piruvato

PVDF: difluoruro de polivinilideno

QM: quilomicrones

RE: retículo endoplasmático

RI: resistencia a la insulina

ROS: especies reactivas de oxígeno (acrónimo del inglés: reactive oxygen species)

rpm: revoluciones por minuto

RQ: cociente respiratorio (acrónimo del inglés: respiratory quotient)

RT-PCR: PCR a tiempo real

SCD1: estearoil-CoA desaturasa 1 (acrónimo del inglés: -CoA desaturase 1)

SDS: dodecil-sulfato sódico (acrónimo del inglés: sodium dodecylSulfate)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SEM: error estándar de la media (acrónimo del inglés: standard error of the mean)

SIRT1 y 6: sirtuina 1 y 6

SREBP1c: proteína de unión reguladora de esteroles tipo 1-c (acrónimo del inglés: sterol regulatory elementbinding protein 1c). ***El gen se describe con las siglas: Srebf1***

STD: estándar (acrónimo del inglés: standard), también empleado en el texto para denominar a la dieta estándar de los roedores.

TA beige: tejido adiposo beige

TAB: tejido adiposo blanco

TABep: tejido adiposo blanco epididimal

TABsc: tejido adiposo blanco subcutáneo

TAE: Tris-acetato-EDTA

TAM: tejido adiposo marrón

TCA: ciclo del ácido cítrico o tricarbóxico (acrónimo del inglés: tricarboxylic acid cycle)

TEMED: tetrametil-etilendiamina

TG: triglicéridos

TGF β : factor de crecimiento tumoral beta

TNF: factor de necrosis tumoral

UCP1: proteína desacopladora 1 (acrónimo del inglés: uncoupling protein 1)

VHFD: dieta muy alta en grasa (acrónimo del inglés: very high fat diet)

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (acrónimo del inglés: very low density lipoprotein)

WT: controles de tipo salvaje (acrónimo del inglés: wild type)
 β 3Adr: siglas de receptor adrenérgico β 3

INTRODUCCIÓN

1 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

1.1 EN LÍNEAS GENERALES

El concepto de homeostasis energética es fundamental para inicialmente comprender el desarrollo del síndrome metabólico. Desde el punto de vista etimológico, la palabra homeostasis está compuesta de dos raíces de origen griego, “homoios” que significa “igual o similar” y “stasis” con un significado de estabilidad. Sin embargo, el concepto básico de qué significa realmente la homeostasis energética, solamente fue elaborado tras el desarrollo de estudios que involucran la regulación del apetito, el metabolismo energético y otros procesos relacionados con la ingesta de alimentos. Por mucho tiempo, no había una definición concreta de la homeostasis energética. Basada en la primera (Principio de la Conservación de la Energía) y segunda ley (Principio de la Entropía) de la termodinámica, la homeostasis energética es caracterizada por un conjunto de mecanismos complejos que los organismos vivos desempeñan para mantener un equilibrio energético interno¹.

Es importante destacar que la homeostasis energética se sustenta en la primera ley de la termodinámica, por mantener la cantidad total de energía en un organismo siempre constante en el tiempo, cuando no haya entrada o salida de energía de este sistema¹. Es decir, este sistema cerrado u organismo, para mantener su balance energético interno, debe buscar un equilibrio entre la cantidad de energía consumida (por medio de la alimentación) con la cantidad de energía utilizada (por intermedio del metabolismo basal, de la actividad física y de la termogénesis adaptativa). Además, la segunda ley de la termodinámica también demuestra fuertemente como los organismos vivos cumplen los principios de la conservación y eficiencia energética para mantener la homeostasis energética. El principio de la Entropía se relaciona directamente al proceso de equilibrio energético, ya que todos los organismos deben regularse para maximizar la eficiencia en el uso de la energía y opuestamente minimizar el desperdicio de energía. Luego, este organismo evita el estado de mayor desorden y aleatoriedad, que es el estado de aumento de la entropía (Medida del desorden de un sistema)¹.

Para entender mejor la complejidad y simplificar el proceso de homeostasis energética, vamos a explorar un concepto brevemente introducido, el balance energético. Este concepto, parte de una ecuación básica, que es la siguiente:

$$\Delta_{\tau}\text{Energía almacenada} = \Delta_{\tau}\text{Consumo de energía} - \Delta_{\tau}\text{Energía gastada}$$

Esta ecuación, entendida a mediados del siglo XIX, implica la siguiente relación: la Δ_{τ} energía almacenada equivale a la diferencia entre el Δ_{τ} consumo de energía (ingesta de alimentos) y la Δ_{τ} energía gastada a través del metabolismo basal, del ejercicio físico y de la termogénesis adaptativa (Imagen 1)².

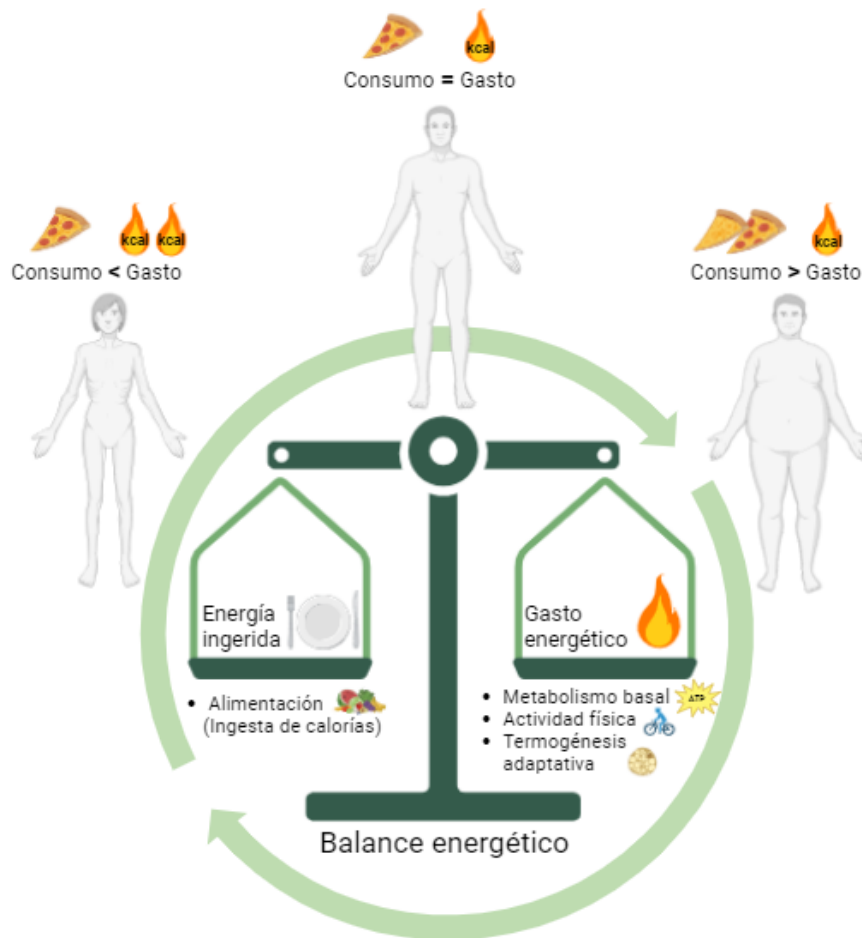


Imagen 1. Balance energético (elaboración propia, mediante Biorender).

El balance energético mantenido por un organismo se logra cuando el aporte de energía proveniente de la ingesta de alimentos es igual al gasto de energía para sustentar al cuerpo. Es importante destacar que no todo alimento consumido será absorbido, una pequeña fracción es excretada por filtración renal o eliminación fecal. Todas las regulaciones metabólicas se realizan en función del nivel de suministro de nutrientes al cuerpo, lo que conducirá a diferentes vías. Así, se observa que la homeostasis energética se producirá de diferentes maneras, cuando el cuerpo se encuentre en un estado de privación de alimentos (balance energético negativo) o de aporte excesivo de nutrientes (balance energético positivo)²⁻⁴. Como la energía ingerida proviene solamente de la alimentación, la variación energética dependerá directamente de tres factores: tasa metabólica basal (TMB), actividad física y termogénesis adaptativa.

La tasa metabólica basal (TMB), se define como el gasto energético mínimo de un organismo para mantener funciones vitales en un estado de reposo dentro de un ambiente termoneutral, que además puede variar de acuerdo con la masa corporal del organismo, con tasas fisiológicas y bioquímicas y con el mismo exponente alométrico que la tasa metabólica de campo⁵. Es importante resaltar que hormonas como, hormonas tiroideas, adrenalina/noradrenalina y cortisol por ejemplo, afectan la tasa metabólica basal de acuerdo con su concentración. Individuos con hipertiroidismo son más susceptibles a la pérdida de peso mientras individuos con hipotiroidismo suelen ganar peso debido a una disminución de la actividad metabólica⁶. En pacientes con reacciones alérgicas graves, el uso de adrenalina es una alternativa de tratamiento al ser un estimulante cardíaco muy potente. Estudios demuestran que

la infusión de adrenalina aumenta significativamente el gasto energético en reposo (REE) en un 12% y el cociente respiratorio (RQ) en sujetos sanos, debido al aumento de la oxidación de hidratos de carbono⁷. Además, la “hormona del estrés”, el cortisol aumenta la tasa metabólica basal (TMB) de mujeres durante el embarazo, lo que indica una relación importante entre el cortisol y el ajuste del peso y de la composición corporal de la madre^{8,9}.

La actividad física, se caracteriza por un conjunto de movimientos corporales voluntarios producidos por los músculos esqueléticos, que consecuentemente irán produciendo un desequilibrio energético inicial de aproximadamente 2MJ/día. Es evidente que este desequilibrio a largo plazo será diferente en cada individuo, de acuerdo con su composición corporal y la intensidad diaria de actividad física¹⁰. Como respuesta compensatoria al aumento del gasto energético, el organismo aumenta los estímulos de ingesta de alimentos para que la energía gastada sea compensada a través de un mayor consumo calórico^{10,11}.

La termogénesis adaptativa, es un proceso de producción de calor ejecutada por el tejido adiposo marrón (TAM o *brown adipose tissue*, BAT) que resulta en un aumento de la tasa metabólica basal, buscando un control de la homeostasis energética, principalmente en respuesta al frío o también a un estímulo simpático¹². El proceso de termogénesis se debe a la alta concentración de mitocondrias presentes en los adipocitos marrones, que tienen el papel de activar la proteína desacopladora 1 (UCP-1) que a su vez será la responsable de la disipación de energía en forma de calor^{13,14}. Los adipocitos marrones son más activos en los mamíferos que hibernan y en los recién nacidos, aunque estén presentes en los individuos adultos. El papel de la termogénesis adaptativa, además de ser importante en el equilibrio energético, puede ser una vía alternativa para la terapia de la diabetes tipo 2 y de las enfermedades metabólicas como la obesidad¹².

La homeostasis energética es un sistema de control sustancial que domina todo el organismo, tanto a nivel celular como sistémico, buscando mantener estable el metabolismo interno, evitando cambios significativos¹⁵. A través de la ingesta de alimentos, mecanismos fisiológicos, equilibrio de nutrientes y procesos oxidativos celulares, el organismo es capaz de garantizar la homeostasis energética. Sin embargo, esta homeostasis puede verse afectada por constantes interferencias, que en consecuencia alteran su equilibrio. Algunos factores como la escasez o abundancia de alimentos, lesiones cerebrales, toxinas, procesos inflamatorios, estilo de vida y otros factores ambientales, pueden alterar la homeostasis del cuerpo. Cuando estos factores estresantes alteran la homeostasis energética, el cuerpo utiliza mecanismos que buscan el retorno a su patrón fisiológico¹⁶⁻¹⁸.

El organismo tiene formas homeostáticas y no homeostáticas de controlar el consumo de alimentos y el equilibrio energético. El control homeostático depende principalmente del hipotálamo y del sistema endocrino. Los núcleos hipotalámicos están formados por circuitos internos de neuronas que actúan como sensores de las señales hormonales y otros metabolitos, y en consecuencia envían respuestas para mantener el equilibrio energético. Por otro lado, el control no homeostático está relacionado principalmente con el sistema cortico-límbico del cerebro, que es responsable de los efectos sensoriales de los alimentos en el cuerpo. A través de experiencias positivas provocadas por el consumo de alimentos muy sabrosos, el organismo se modula y se vuelve más susceptible a sus efectos. Una experiencia positiva con un tipo de alimento podrá generar una memoria asociativa, la cual será recordada a través de estímulos sensoriales como sensaciones visuales y olfativas. Sin siquiera ingerir el alimento, el cuerpo ya conocerá los efectos que se derivan de su consumo^{18,19}.

2 EL HÍGADO

El hígado es un órgano metabólico que desempeña un papel vital en el metabolismo al regular el almacenamiento y la liberación de nutrientes como carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Todo esto es posible debido su estructura densamente vascularizada y con distintos compartimentos como la vena porta, la vena central, la arteria hepática y los sinusoides. Además, la presencia de células con funciones especializadas según su ubicación dentro del órgano, contribuye a sus funciones metabólicas generales²⁰.

En el contexto del metabolismo, el hígado regula procesos metabólicos como la glucogenólisis, la gluconeogénesis, la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos para gestionar los niveles de energía en el cuerpo. La expresión genética metabólica de este órgano está controlada por el reloj circadiano, lo que garantiza la coordinación con los estados de alimentación y ayuno para un equilibrio energético adecuado. Tras la absorción de los nutrientes por el intestino, la respuesta del hígado será influenciada por hormonas como la oxintomodulina y la grelina, que vinculan las actividades intestinales con las funciones hepáticas. Otra hormona de igual importancia y que actúa directamente en el hígado, es la insulina. Un mensajero responsable por indicar al tejido hepático el almacenamiento del exceso de glucosa en forma de glucógeno para su uso posterior como fuente energética, además de fomentar la síntesis de triglicéridos en el hígado para el almacenamiento de energía²⁰⁻²².

2.1 HOMEOSTASIS LIPÍDICA EN EL HÍGADO

El hígado se encarga de metabolizar una amplia gama de lípidos, destacándose diferentes grupos como, los ácidos grasos no esterificados (NEFAs), triacilgliceroles y acil graso-CoA. El mecanismo de metabolización de los lípidos en el hígado está estrechamente regulado por receptores nucleares como la proteína 1c de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c) y el receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR α), que influyen en la transcripción de genes para la síntesis y oxidación de lípidos²³. Además, es importante destacar que los lípidos metabolizados por las células hepáticas son provenientes de, un aporte directo de la dieta, del tejido adiposo mediante la lipólisis y de la lipogénesis *de novo* (LDN).

2.1.1 Captación de lípidos circulantes

Tras el consumo de alimentos, la grasa (gran mayoría en forma de triglicéridos) procedente de la dieta, ingresa al hígado como restos de quilomicrones o ácidos grasos derivados de quilomicrones, que son productos de la digestión y absorción de grasas en los intestinos²⁴. Los quilomicrones se forman durante la absorción de lípidos en el intestino, ensamblando los lípidos en partículas grandes y esféricas ricas principalmente en triacilgliceroles (TAG). El ensamblaje de los quilomicrones se da con la acción de la apolipoproteína B-48 (ApoB48) y de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP). Mientras ApoB48 proporciona un marco estructural para la integración de los lípidos, MTP interactúa con los lípidos y los trasfiere a la ApoB naciente, lo que ayuda a la aceptación de los lípidos^{25,26}. Estos productos de la digestión son absorbidos por los enterocitos mediante difusión. Desde la mucosa intestinal, los quilomicrones son transportados en gran medida para el sistema linfático tanto en forma esterificada como libre, donde son drenados a la circulación sanguínea asociándose a apolipoproteínas²⁷.

Una vez llegado al hígado, el tejido hepático toma los lípidos de los quilomicrones y los procesa para almacenarlos como reservas de energía o utilizarlos para diversas funciones metabólicas²⁸. La otra parte de los ácidos grasos circulantes en sangre que llegan al hígado son provenientes del proceso de lipólisis del tejido adiposo blanco. Dentro de los adipocitos, el proceso de lipólisis resulta en la descomposición del triacilglicerol (TAG) en ácidos grasos y glicerol. Este proceso está regulado por, hormonas como la leptina y las catecolaminas que son responsables por la estimulación de este proceso mediante la activación de enzimas lipolíticas. Las proteínas como G α , lipasa sensible a hormonas (HSL) y perilipina A son cruciales para mediar los efectos de la leptina y de las catecolaminas sobre la lipólisis. Además, enzimas como adiponutrin, desnutrin y nuevas lipasas como desnutrin/ATGL son responsables de catalizar la hidrólisis de los TAGs. La insulina, por otro lado, inhibe la lipólisis suprimiendo la actividad del HSL, favoreciendo el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo²⁹.

Una vez en la sangre, los lípidos serán internalizados para el hígado, a través de transportadores transmembranas como, las caveolinas, FATP (proteína transportadora de ácidos grasos especialmente del tipo 2 y 5) y CD36. Dentro del grupo de las caveolinas, CAV1 regula el transporte de colesterol y la distribución de las membranas en el hígado³⁰. FATP2 funciona como una proteína transportadora de ácidos grasos y acil-CoA sintetasa 1 de cadena muy larga en el hígado. La expresión de FATP2 está controlada por el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR α) y por FoxA1. La eliminación de FATP2 en el hígado influye en la expresión de genes regulados por PPAR α , lo que afecta el panorama metabólico a través de las vías de señalización de PPAR α ³¹. El último transportador citado CD36, se encarga de regular la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado y media la absorción hepática de ácidos grasos (AG). El aumento de la expresión de CD36 puede provocar una mayor absorción de ácidos grasos y acumulación de triglicéridos, sin embargo la inhibición de CD36 en los hepatocitos reduce el contenido de triglicéridos, disminuye la acumulación de ácidos grasos insaturados y mejora la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasas^{32,33}. CD36 influye en la secreción de VLDL en humanos, ya que su eliminación produce una supresión del 60% de la producción de VLDL, lo que demuestra su importancia en el transporte de lípidos³². Cuando hay remanentes de VLDL extracelular, estas moléculas pueden volver al hígado a través de una hidrólisis ejecutada por LPL. La relación entre los componentes de superficie y núcleo de las partículas VLDL, junto con la presencia de la apoproteína CII como cofactor de LPL, explica la preferencia de LPL por partículas VLDL más grandes como sustratos³⁴. La hidrólisis de VLDL genera, ácidos grasos libres y monoglicéridos resultantes que también pueden ser absorbidos por otros tejidos del cuerpo, como tejido adiposo blanco (almacenamiento), tejido adiposo marrón (producción de calor) y tejidos musculares (producción de energía)³⁵.

2.1.2 Lipogénesis de novo hepática

La lipogénesis *de novo* (LDN o DNL, *De novo lipogenesis*) es la segunda mayor fuente de lípidos en el hígado y contribuye significativamente para el desarrollo de MASLD (Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica), al aumentar la acumulación hepática de TGs a través de la síntesis de ácidos grasos. Se observa tasas más altas de LDN hasta el doble, en individuos con MASLD comparados con aquellos con niveles bajos de grasa hepática. El análisis de datos transcripcionales ha revelado niveles elevados de reguladores clave y enzimas de LDN en pacientes con MASLD, como SREBP1c, ACC y FAS, lo que vincula aún más la LDN con la progresión de la enfermedad. Además, se destaca que la inhibición de estas enzimas clave implicadas en la LDN puede ser explorada como un posible

enfoque terapéutico para la MASLD, enfatizando la importancia de la LDN en la progresión de la enfermedad^{36,37}.

El primer paso de este proceso empieza con la activación transcripcional de genes lipogénicos, incluidos aquellos que codifican enzimas esenciales para la síntesis de ácidos grasos. Una proteína con un papel crucial en la transcripción de genes lipogénicos que incluyen ACC y FAS, es SREBP1c. Esta proteína participa en la regulación de LDN, uniéndose a elementos reguladores de esteroides en los promotores de genes diana. La insulina, a través de la vía fosfoinositida-3 quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (PKB) activa SREBP1, tanto transcripcional como postraduccionalmente. Una vez activado, SREBP1c se traslada al núcleo, donde promueve la transcripción de genes lipogénicos, impulsando el proceso de lipogénesis *de novo* en el hígado. Se ha demostrado que el desequilibrio de SREBP1c en MASLD contribuye a la esteatosis hepática y la acumulación de gotitas de lípidos, características clave de la enfermedad³⁷⁻³⁹. Es importante resaltar que la actividad de SREBP1c está regulada por la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR). La vía de señalización mTOR, específicamente mTORC1 y mTORC2, desempeña un papel crucial en la regulación de la lipogénesis *de novo*. mTORC1 actúa en la activación de SREBP1 mediada por Akt. Se ha observado que la rapamicina, un inhibidor de mTORC1, bloquea la expresión de genes clave de la lipogénesis, incluidos ACC, FAS y SCD1, lo que muestra la participación de mTORC1 en la biosíntesis de los ácidos grasos⁴⁰⁻⁴².

Otra proteína que actúa similarmente a SREBP1 es ChREBP. Esta proteína es un factor de transcripción que desempeña un papel crucial en la regulación de los genes implicados en LDN. ChREBP se activa mediante el aumento posprandial en el suministro de glucosa a los hepatocitos. Luego, se traslada al núcleo tras la desfosforilación, lo que lleva a la activación de genes lipogénicos que contienen el elemento de respuesta a los carbohidratos (ChoRE). Estudios proponen que la glucosa 6-fosfato (G6P) y la fructosa-2,6-bisfosfato como posibles reguladores de la actividad de ChREBP en los hepatocitos^{37,39,43}.

Tras la transcripción de genes lipogénicos y el consecuente reclutamiento de ACC y FAS, se da inicio la producción de malonil-CoA a partir de un precursor de acetil-CoA citoplasmático (procedente del piruvato), regulado por la acetil-CoA carboxilasa (ACC)³⁷. Vale destacar que este paso se considera limitante de la velocidad de la síntesis de ácidos grasos. La malonil-CoA producida se transfiere luego a la proteína transportadora de acilo (ACP) dentro del complejo multienzimático FAS, donde sirve como monómero para una mayor elongación de las cadenas de ácidos grasos³⁷.

A continuación, FAS convertirá la malonil-CoA en palmitato, un ácido graso saturado. Este es un proceso de conversión vital para sintetizar ácidos grasos a partir del exceso de carbohidratos, con el objetivo de almacenarlos en forma de triglicéridos. Esta conversión ocurre mediante series de reacciones en cadena. FAS cataliza la condensación de acetil-CoA y malonil-CoA, formando β -cetoacil-ACP bajo su actividad β -cetoacil sintasa (KS). Posteriormente, FAS participa en la reducción del grupo β -cetona de la β -cetoacil-ACP para producir un intermedio de β -hidroxiacil-ACP utilizando NADPH como cosustrato. Por último, la cadena acilo alargada se libera con la ayuda del dominio tioesterasa (TE) de FAS, generando ácidos grasos como el ácido palmítico, ácido mirístico y el ácido esteárico³⁷. Con los ácidos grasos formados, la enzima esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1), participa catalizando la conversión de ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido palmítico en ácido palmitoleico. Esta conversión por parte de SCD1 es esencial para generar lípidos con funciones específicas necesarias para diversos procesos biológicos, incluida la regulación de la fluidez de la membrana y las vías de señalización^{39,44,45}.

2.1.3 Oxidación hepática de los ácidos grasos

Cuando los ácidos grasos no son transformados en triglicéridos o no son exportados de los hepatocitos, ellos son catalizados. Los ácidos grasos se oxidan en las mitocondrias para proporcionar ATP y NADH para funciones hepáticas como la cetogénesis y la gluconeogénesis, que ayudan a regular la glucosa en sangre y proporcionan combustible alternativo, principalmente cuando los niveles de glucosa circulante son bajos⁴⁶. Es importante destacar, que la proteína PPAR α tiene un importante papel en este proceso, al inducir la transcripción de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias, peroxisomas y citocromos, lo que ayuda a reducir los niveles de lípidos hepáticos⁴⁷.

En primer lugar, los ácidos grasos deben liberarse de los triglicéridos antes de sufrir una beta-oxidación de manera coordinada dentro de las mitocondrias. Sin embargo, con la sobrecarga de lípidos, AGs de cadena muy larga o la función mitocondrial comprometida, los ácidos grasos son direccionados a una oxidación alternativa en los peroxisomas y citocromos.

La β -oxidación peroxisomal es un proceso de oxidación de ácidos grasos desarrollado en los peroxisomas. Los ácidos grasos de cadena larga se degradan en acil-CoA de cadena media, produciendo acetil-CoA, utilizado para la producción de energía. Inicialmente los ácidos grasos son transportados a estos orgánulos a través de FABP1. En el paso inicial, acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1) promueve una catalización contribuyendo a la descomposición de los ácidos grasos en derivados de acil-CoA. Una vez formado el acetil-CoA, esta molécula se dirige a la mitocondria para producir más energía a través del ciclo del ácido cítrico⁴⁶⁻⁴⁸. Se ha visto que pacientes con MASLD pueden presentar una respuesta compensatoria, a través de niveles más altos de ARNm de ACOX y acil-CoA oxidasa de cadena ramificada, que indican una regulación positiva de la FAO peroxisomal para contrarrestar la esteatosis progresiva⁴⁷.

La segunda vía alternativa, es la omega oxidación (ω -oxidación), mediante enzimas citocromo. Este proceso de oxidación ocurre en las mitocondrias, donde las enzimas citocromo forman parte de la cadena de transporte de electrones responsables de la producción de ATP. La oxidación mediada por citocromo involucra enzimas como las enzimas citocromo p450 (CYP) en el hígado que usan NEFA como sustratos para generar ácidos grasos hidroxilo, epoxy e hidroxilo. La oxidación mediada por citocromo contribuye a la regulación de factores de transcripción en respuesta a cambios en las vías de señalización intracelular, influyendo en su estado de fosforilación^{46,47}.

En la vía principal, los ácidos grasos ingresan a las mitocondrias para su oxidación a través de la acil-CoA deshidrogenasa y de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) ubicada en la membrana mitocondrial externa. Vale destacar que coenzimas como NAD⁺ y FAD son implicadas en las reacciones redox que tienen lugar durante la β -oxidación. El proceso ocurre en las mitocondrias e implica una serie de reacciones que descomponen los ácidos grasos en unidades de acetil-CoA. Los ácidos grasos se activan primero mediante la unión a CoA, formando acil graso-CoA. Luego, se producen ciclos sucesivos de oxidación, hidratación, oxidación y tiolisis para escindir unidades de dos carbonos en forma de acetil-CoA. De esta forma, los productos finales de la β -oxidación son acetil-CoA, NADH y FADH₂, que ingresan al ciclo del ácido cítrico para una mayor producción de energía (ATP). Este proceso ayuda a utilizar eficientemente los ácidos grasos como fuente de energía en el hígado para respaldar diversas funciones metabólicas. El ATP y NADH producidos son utilizados para funciones hepáticas como la gluconeogénesis y la cetogénesis, que ayudan a regular la glucosa en sangre y proporcionan combustible alternativo^{46,47,49,50}.

Aunque la oxidación de ácidos grasos (FAO) ayuda en el metabolismo de los lípidos, también conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que contribuye al estrés oxidativo y la progresión de la enfermedad⁴⁷.

2.2 PAPEL DEL HÍGADO EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

El hígado desempeña un papel crucial en la homeostasis de la glucosa al controlar diversas vías del metabolismo de la glucosa, incluidas la glucogénesis, la glucólisis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Además, el metabolismo de la glucosa en el hígado está interconectado con el metabolismo de los ácidos grasos y las reacciones de glucosilación, lo que destaca su importancia en las funciones metabólicas generales^{51,52}.

2.2.1 Captación, síntesis de glucógeno y gluconeogénesis

El hígado desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa al almacenar y liberar glucosa según la necesidad. Como mencionado anteriormente, hormonas como la insulina y el glucagón, van a regular el proceso, de acuerdo con el estado nutricional del individuo. Cuando hay niveles bajos de glucosa en la sangre, el glucagón secretado, estimula la gluconeogénesis hepática, promoviendo la producción de glucosa en el hígado. Tiene una respuesta opuesta a la de la insulina favoreciendo la degradación del glucógeno y la síntesis de glucosa. Ya en un estado postprandial, la insulina ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre al facilitar la absorción de glucosa en las células para la producción de energía. Además, suprime la gluconeogénesis hepática. De esta manera, promueve el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado y en los músculos⁵³.

Al llegar en el tejido hepático, a través de la vía metabólica PI3K/AKT, la insulina promueve la captación de glucosa por los hepatocitos. La glucosa será captada a través del transportador de glucosa del tipo 2 (GLUT-2), de baja afinidad y alta capacidad que permite la entrada de glucosa aunque presente en altas concentraciones. Es un transportador facilitador de glucosa que se encuentra tanto en el hígado, como en las células β del páncreas. GLUT-2 está regulado por los niveles de insulina y glucosa, lo que afecta su función en la captación y liberación de glucosa. Además, GLUT-2 tiene un alto K_m para la glucosa, lo que le permite transportarla bidireccionalmente a través de la membrana plasmática en función de gradientes de concentración^{51,54}.

Tras la entrada de la glucosa al citoplasma celular, la glucoquinasa (GK) se encargará de convertir la glucosa en glucosa 6-fosfato (G6P), iniciando diversas vías metabólicas. GK es una hexoquinasa de alto K_m , que actúa como sensor de glucosa en el hígado y en las células beta pancreáticas. La actividad de GK está regulada por GKR. Cuando los niveles de glucosa aumentan, el GKR libera GK, lo que le permite fosforilar la glucosa en el citoplasma para un mayor metabolismo. Sin embargo, cuando los niveles de glucosa están bajos GKR secuestra GK en el núcleo. Además, varios factores nucleares como SREBP-1c, HNF4a, HNF6, FoxO1 y USF1, regulan GK transcripcionalmente, lo que influye en su actividad en la utilización de glucosa. Se sabe que las mutaciones en el gen GK pueden provocar alteraciones en el metabolismo de la glucosa, afectando la secreción de insulina y la acumulación de glucógeno hepático^{51-53,55}. Además, se ha visto que las mutaciones en el gen de la GK están directamente implicadas en el desarrollo de MASLD^{56,57}.

La síntesis de glucógeno se da por la activación de la glucógeno sintasa que está regulada por la señalización de la insulina y la concentración de glucosa 6-fosfato. Este proceso se activa en el estado de alimentación, cuando se secreta insulina en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre, ácidos grasos y aminoácidos, estimulando la glucógeno sintasa a través de la activación de Akt. Además, la insulina promueve la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), un regulador negativo de la glucógeno sintasa, lo que conduce a una mayor síntesis de glucógeno. Otra vía que puede conducir a la síntesis de glucógeno es la vía ERK/RSK. Esta vía es estimulada por la actividad del factor de crecimiento

de fibroblastos 15/19 (FGF15/19)⁵³. La glucogénesis implica el alargamiento de las cadenas de glucógeno facilitado por la enzima glucógeno sintasa. Esta enzima, cataliza la transferencia de residuos de glucosa al extremo no reductor de la rama de glucógeno preexistente, formando de esta forma un nuevo enlace glucosídico. Por otra parte, la glucógeno sintasa puede ser inactivada por la acción de proteínas como la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y por la proteína quinasa A (PKA). Se ha visto en estudios con ratas que la inhibición de GSK mejora la eliminación de glucosa y la síntesis de glucógeno específicamente en el hígado⁵⁸. Ya PKA, conduce a la inhibición de la glucógeno sintasa, impidiendo la conversión de glucosa en glucógeno, que es esencial para mantener los niveles de glucosa en sangre⁵⁴.

Otro mecanismo de aporte de glucosa, ejecutado en el hígado es la gluconeogénesis. Por medio de la gluconeogénesis, el hígado es capaz de producir glucosa a partir de la transformación de precursores no carbohidratos como el piruvato, lactato, los aminoácidos y el glicerol⁵⁹. El papel de la gluconeogénesis es fundamental, para la manutención de los niveles de glucosa en sangre durante períodos de ayuno o durante ejercicios prolongados, cuando la disponibilidad inmediata de glucosa está limitada⁶⁰. Sin embargo, también se puede activar durante el período de absorción posprandial, impulsada por una mayor captación hepática de glucosa, señales hormonales y de metabolitos en la vena porta. Este proceso involucra diversas enzimas clave como, piruvato carboxilasa, PEP carboxiquinasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa, que participan directamente en la conversión de sustratos en glucosa. Vale destacar que algunas moléculas como lactato y alanina, deben ser convertidas en piruvato para iniciar los procesos de reducción⁶¹. El paso inicial, se da con la conversión de piruvato en oxalacetato, a través de la piruvato carboxilasa. En seguida, esta molécula se convierte en fosfoenolpiruvato (PEP) por la acción de otra enzima, la PEP carboxiquinasa. Además, la PEPCK mitocondrial puede convertir directamente la OAA mitocondrial en PEP, que luego ingresa al ciclo gluconeogénico. El paso final implica la conversión de glucosa-6-fosfato en glucosa libre mediante la enzima glucosa-6-fosfatasa. Esta glucosa recién sintetizada puede luego liberarse en la sangre para que sea distribuida a los demás tejidos del cuerpo (Imagen 2)^{59,62}.

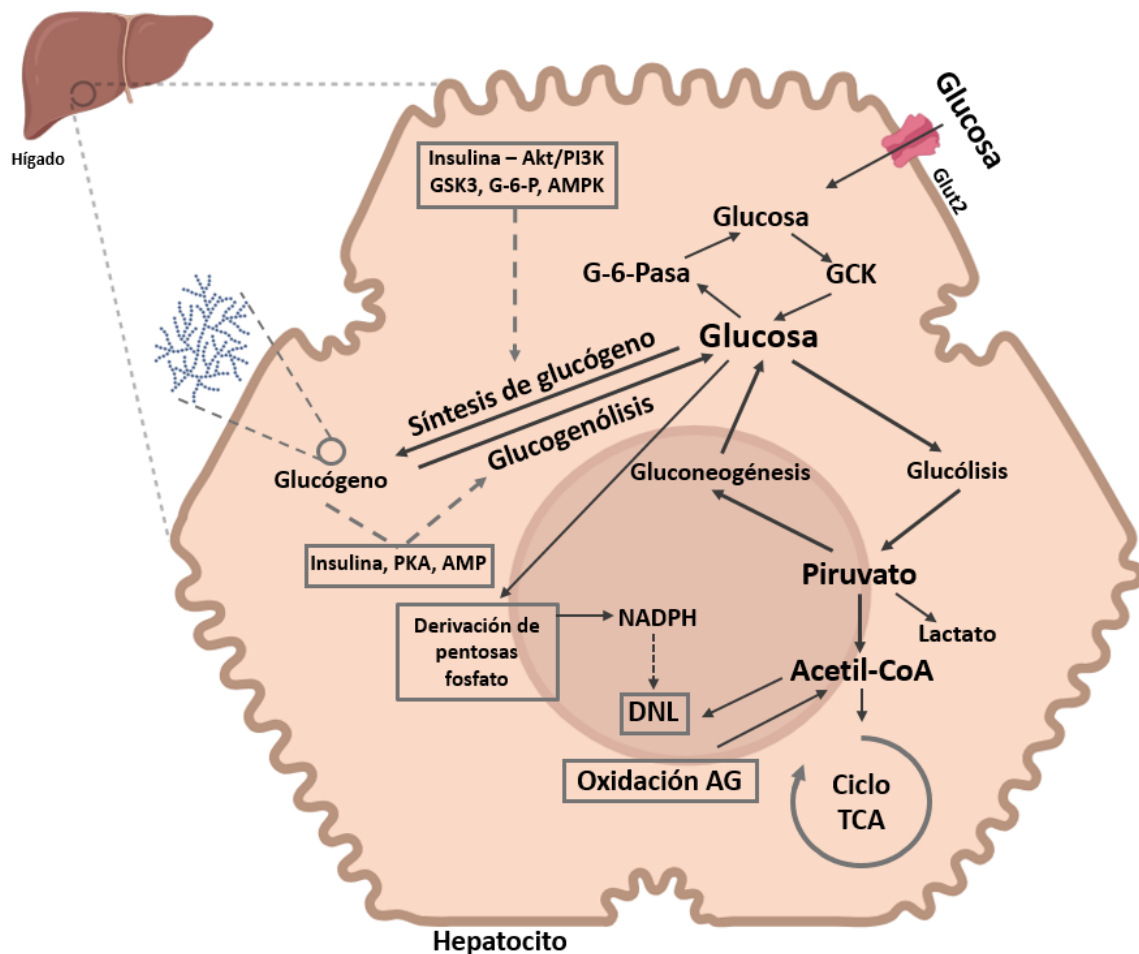


Imagen 2. Metabolismo hepático de la glucosa (elaboración propia, mediante Biorender). DNL= *de novo* lipogenesis, Ciclo TCA = ácido tricarboxílico, AG = ácidos grasos.

2.2.2 Glucólisis

Contrario a lo que ha sido descrito sobre la gluconeogénesis, el proceso de glucólisis celular realiza la conversión de la glucosa en piruvato, generando 2 moléculas de NADH y 2 de ATP, para proporcionar energía a las células. Es importante destacar las enzimas clave como GK, HK, PFK1 y PKM2 (subtipo), que desempeñan funciones cruciales al incrementar su actividad glucolítica⁶³. La proteína reguladora de la glucocinasa (GCKR) se une a la glucocinasa (GCK) en el núcleo durante el ayuno, sin embargo en presencia de la glucosa, la GCK se libera en el citosol para fosforilar la glucosa en glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es un intermediario central en el metabolismo de la glucosa hepática, que puede procesarse aún más mediante la glucólisis para producir energía⁵⁵. La activación de los factores de transcripción como ChREBP induce a la expresión de genes como PK. Específicamente, el subtipo PKM2, interactúa con reguladores clave como HIF-1 α , con el objetivo de mejorar la transcripción de genes glucolíticos y de esta forma mantener el proceso glucolítico en las células hepáticas⁶⁴. El producto final de la glucólisis, el piruvato, puede luego descarboxilizarse a acetil-CoA, que ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para una mayor producción de energía o puede ser utilizado en otras vías metabólicas⁵⁵. Además, el piruvato puede convertirse en ácido oxaloacético mediante la piruvato carboxilasa⁶⁵.

Se pueden observar cambios en la glucólisis en diversas enfermedades, incluido en el hígado graso, donde las enzimas clave relacionadas con la glucólisis están reguladas positivamente en comparación con las condiciones normales. En MASLD, la glucólisis hepática aumenta, lo que lleva a un aumento de los niveles de ARNm de las enzimas relacionadas con la glucólisis, como HK2, PFKm y PKm, comparado a un estado fisiológico normal. Otro factor que influye en la sobreexpresión de enzimas glucolíticas en MASLD, son los efectos directos atribuidos al eje P13K/AKT2/PPAR γ . Además, se ha visto que la inhibición de NLRX1 o SIRT6 en el hígado puede modular la expresión de los genes glucolíticos, lo que provoca cambios en la glucólisis y el desarrollo de MASLD⁶⁶.

2.2.3 El ciclo del ácido cítrico en los hepatocitos

El ciclo del ácido cítrico (también llamado ciclo de Krebs, ciclo del ácido tricarbóxico, TCA), es esencial para la producción de energía y es un punto clave en la interconexión de las principales rutas metabólicas del organismo. Este ciclo es de extrema importancia, por proporcionar también, intermediarios utilizados en la síntesis de glucosa, lípidos y aminoácidos, lo que demuestra su papel en diversas vías metabólicas. Por medio de una serie de reacciones enzimáticas ejecutadas dentro de las mitocondrias, el ciclo del ácido cítrico convierte de forma eficiente los nutrientes en moléculas ricas en energía, apoyando las funciones celulares y el metabolismo energético general⁶⁷.

El metabolito acetil-CoA derivado de la degradación de los ácidos grasos, aminoácidos, hidratos de carbono y cuerpos cetónicos entra en el ciclo del ácido cítrico como la molécula inicial clave. El acetil-CoA sufre una serie de reacciones enzimáticas en las mitocondrias para producir moléculas ricas en energía como NADH y FADH₂ para la cadena de transporte de electrones. Inicialmente, el acetil-CoA y el oxaloacetato se combinan para formar citrato, catalizado por la citrato sintetasa. El citrato obtenido se convierte en isocitrato por acción de la aconitasa, facilitando la conversión del isocitrato en α -cetoglutarato. A partir de este punto, el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, convierte el α -cetoglutarato en succinil-CoA. El succinil-CoA es un compuesto de cuatro carbonos de alta energía que será convertido a succinato, malato y finalmente a oxaloacetato, completando el ciclo⁶⁸.

Para que el ciclo funcione correctamente es necesario que los componentes del ciclo sean regulados para la manutención de su equilibrio. Una familia de coactivadores estrechamente relacionada a la regulación transcripcional del ciclo del ácido cítrico es la del coactivador del receptor gamma 1 (PGC1). PGC1 desempeña un papel en el inicio del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) al desencadenar la producción de acetil-coenzima A (CoA) a partir de ácidos grasos, aminoácidos u oxidación de piruvato. Además, se ha visto que la sobreexpresión de PGC1 α mejora la expresión de reguladores metabólicos, incluidas las enzimas del ciclo del ácido cítrico como la citrato sintetasa. Por otro lado, la deficiencia de PGC1 α puede provocar una reducción de genes implicados en la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de ATP, lo que afecta la eficiencia del ciclo del ácido cítrico⁶⁹.

3 DESEQUILIBRIO DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Aunque el organismo presente formas de controlar el equilibrio energético, diversas patologías son capaces de conducir a un desequilibrio de la homeostasis energética a través de múltiples

mecanismos, afectando la señalización neuronal, la regulación hormonal, la inflamación sistémica, entre otros procesos fisiológicos.

3.1 LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO

La obesidad es una condición caracterizada por una acumulación excesiva de grasa corporal, debido a un desequilibrio entre el gasto energético y consumo de alimentos generando un balance energético positivo con potenciales efectos nocivos para la salud. El excedente calórico se almacena en los adipocitos en forma de triglicéridos (TG), lo que provoca una expansión en su tamaño y número, desencadenado por el proceso de adipogénesis⁷⁰.

La obesidad es considerada como una enfermedad pandémica por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras organizaciones internacionales, por alcanzar niveles globales afectando a un gran número de individuos. En 2022, según la OMS, 2.500 millones de adultos (de 18 años o más) tenían sobrepeso. Dentro de este grupo, 890 millones vivían con obesidad. Desde 1990 hasta los días de hoy, la obesidad adulta se ha duplicado. Los datos relativos a los niños y adolescentes son igualmente preocupantes. También en 2022, 37 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso y más de 390 millones de niños y adolescentes de 5 a 19 años también sufrían de sobrepeso, siendo 160 millones de este grupo considerados obesos⁷¹. En general, para clasificar un individuo con sobrepeso u obesidad se utiliza el índice de masa corporal (IMC). Este índice es determinado por la masa en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros (kg/m^2) y clasifica a las personas con, sobrepeso (IMC 25,0-29,9) u obesidad ($\text{IMC} \geq 30,0$)⁷². Además de los problemas individuales que la obesidad puede promover a las personas, sus consecuencias pueden extenderse a varios países, incluso impactando aún más los países de ingreso bajo y mediano. El aumento de las tasas de obesidad, consecuentemente aumentan los costes totales de atención médica, lo que plantea un desafío financiero tanto para los pacientes como para los sistemas de atención médica. Eso resalta el real impacto de la obesidad en la economía de un país, forzando a los gobiernos plantear cargas económicas sustanciales a la sociedad, destacando la importancia de medidas preventivas y estrategias de manejo efectivas para mitigar sus consecuencias^{70,73}.

La obesidad es una enfermedad de etiología compleja y multifactorial, influenciada por predisposición genética, factores biológicos y de comportamiento, consumo de comida hipercalórica, influencias culturales, estatus socioeconómico y elecciones de estilo de vida, que en última instancia conducen a un desequilibrio entre el consumo y el gasto de energía. Además, la obesidad se asocia con diversas comorbilidades como, diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensión, enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, problemas respiratorios, apnea del sueño, osteoartritis y algunos tipos de cánceres. Eso se debe a la propensión de los individuos obesos de desarrollar estas afecciones en comparación con aquellas con peso normal, lo que lleva a un aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad^{70,74}.

La obesidad se ha convertido en el foco de investigaciones con el objetivo de desarrollar potenciales fármacos destinados a su tratamiento. Actualmente, no hay una medicación exclusiva contra la obesidad, sino un tratamiento coadyuvante. De acuerdo con la FDA (*Food and Drug Administration*) los medicamentos aprobados y recetados para el tratamiento de la obesidad, son: Orlistat (Xenical, Alli), Fentermina/Topiramato (Qsymia), Bupropion/Naltrexona (Contrave), Liraglutida (Saxenda), y Semaglutida (Wegovy)⁷⁰. Además, se puede incluir a la lista, medicamentos considerados “*Off label*” como: Metformina y anfetaminas. El uso de los medicamentos mencionados anteriormente ayuda a controlar el peso al reducir el apetito o la absorción de grasas⁷⁵.

Sin embargo, el tratamiento solamente será eficaz, cuando los medicamentos sean empleados conjuntamente con un cambio de hábitos de vida, incluyendo las dietas con

porciones controladas, el aumento de la actividad física y procesos quirúrgicos cuando sean necesarios (cirugía bariátrica)⁷⁶. Luego todos estos factores pueden conducir a una pérdida de peso a corto plazo y a un control del peso a largo plazo⁷⁰.

La obesidad puede ser considerada un factor de riesgo para el desarrollo de una condición metabólica de gran relevancia, el síndrome metabólico. El síndrome metabólico (inicialmente definido como “síndrome X” o “síndrome de resistencia a la insulina” por Gerald Reaven en 1988) es una afección caracterizada por un conjunto de alteraciones metabólicas que incluyen niveles elevados de glucosa, resistencia a la insulina (RI), alteraciones del metabolismo de los lípidos y factores de riesgo cardiovascular. Las características asociadas al síndrome metabólico engloban, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, reducción del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumento de los triglicéridos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)⁷⁷. De acuerdo con el instituto nacional de salud (NIH, *National Institutes of Health*), para que un individuo sea diagnosticado con el síndrome metabólico, el mismo debe tener al menos tres de los siguientes componentes: circunferencia abdominal elevada, hipertrigliceridemia, presión arterial elevada, bajos niveles de HDL y niveles de glucosa en sangre elevados durante el ayuno. Aunque se haya avanzado en la comprensión mecanicista de esta enfermedad, las redes genéticas, las vías metabólicas alteradas y la falta de nuevas estrategias, demuestran una necesidad de más investigación y conocimiento para prevenir y tratar con más eficacia los individuos portadores de esta condición⁷⁸.

3.2 HÍGADO GRASO ASOCIADO A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MASLD)

3.2.1 Definición, epidemiología y patogénesis

La enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (MASLD), es la nueva terminología introducida en 2020, para reemplazar la antigua definición, Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). El objetivo propuesto por este cambio era establecer una descripción más precisa de la enfermedad del hígado graso asociada con la disfunción metabólica. El nuevo término se caracteriza por integrar diversos aspectos de la enfermedad, incluyendo la epidemiología, la patogénesis, las manifestaciones clínicas, su manejo, además de reflejar su fuerte asociación con el síndrome metabólico y afecciones como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2)⁷⁹.

MASLD se define como la presencia de esteatosis (acumulación de grasa) en más de 5% de los hepatocitos sin tener otros factores de causa, como consumo significativo de alcohol (< 20 g/día en mujeres y < 30 g/día en hombres) y enfermedades hepáticas crónicas competitivas⁸⁰. Es importante destacar, que el término clínico MAFLD abarca una gama continua de enfermedades hepáticas crónicas que siguen una progresión desde el acúmulo de triglicéridos en el hígado (esteatosis no alcohólica o NAFL, *non-alcoholic fatty liver*), caracterizado por una esteatosis simple sin inflamación, hasta el hepatocarcinoma (HCC). Dentro de la evolución de la enfermedad inflamatoria hepática crónica, el hígado graso (NAFL) progresa lentamente (puede tardar más de diez años) a un cuadro de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) caracterizada por una inflamación y potencial fibrosis que puede progresar a una cirrosis hepática y a un hepatocarcinoma, sin la posibilidad de regresión (Imagen 3). En los estadios tardíos, la única opción de tratamiento es el trasplante hepático^{81,82}.

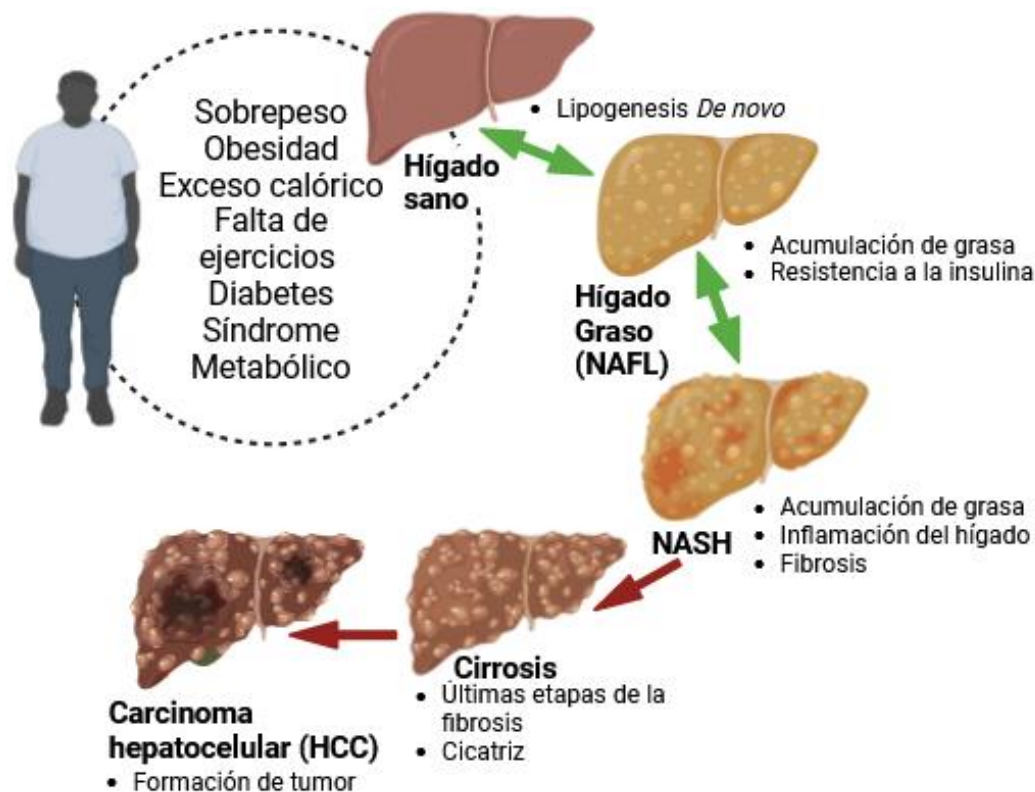


Imagen 3. Progresión de la enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (elaboración propia, mediante Biorender).

La prevalencia de MASLD ha demostrado una tendencia creciente, durante los últimos años. Sin embargo, existe una variabilidad geográfica con tasas de prevalencia más altas en: Oriente Medio (31,8%), en América del Sur (30,4%) y en África (13,5%)⁸⁰. Además, estimativas de 2022 ya mostraban una incidencia de MASLD de 46,9 casos por 1.000 personas-año⁷⁹. MASLD es la causa más común de enfermedad hepática crónica en niños y adolescentes y particularmente la más preocupante debido a sus importantes riesgos para la salud. La mala alimentación, el comportamiento sedentario y otros factores en el estilo de vida, contribuyen para el desarrollo y progresión de MASLD, además de reflejar el aumento global de las tasas de obesidad entre la población juvenil. La aparición temprana de MASLD en la infancia puede conducir a una mayor probabilidad de progresión a otras enfermedades hepáticas más graves en la edad adulta, como también aumentar el riesgo de desarrollo de diabetes, síndrome de resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares, lo que a largo plazo puede tener implicaciones en su salud^{79,83}.

MASLD presenta comorbilidades fuertemente asociadas como: la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la hiperlipidemia y la hipertensión, demostrando su estrecha relación con la disfunción metabólica. Otras comorbilidades menos destacables y no relacionadas con la obesidad también se asocian a MASLD, la osteoporosis, la sarcopenia, neoplasias malignas, infecciones y embolia pulmonar⁸⁰.

En 1998 surge por primera vez, una hipótesis que intenta explicar la progresión de MASLD, la hipótesis de los “dos impactos”. Esta teoría, sugiere un mecanismo de doble impacto en la progresión de esta enfermedad. El “primer impacto”, es el paso inicial clave en el desarrollo de MASLD, la acumulación de triglicéridos y ácidos grasos libres en el hígado. Esto ocurre debido a un proceso generalizado de: aumento de lípidos provenientes de la dieta, de una mayor captación y movilización de los lípidos, aumento de la síntesis endógena de ácidos

grasos, desajuste en la síntesis o secreción de lipoproteínas VLDL y una reducción de la oxidación de los ácidos grasos. De esta forma, se genera la etapa menos progresiva de la enfermedad, NAFL⁸⁴. Con el hígado más sensibilizado, el "segundo impacto" es producido como consecuencia del aumento de los niveles de adipocinas, citocinas inflamatorias, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplasmático (RE), estrés oxidativo y endotoxinas derivadas del intestino, lo que genera un daño celular y apoptosis responsables del *ballooning*, por la inflamación y fibrosis característicos de etapas avanzadas de MASLD. Todos estos elementos van a promover la futura progresión de MASLD a esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

No obstante, sucesivas investigaciones han propuesto cambios muy sustanciales en esta teoría, promoviendo así el surgimiento de una nueva teoría acerca de la patogénesis de MASLD. La hipótesis de los "múltiples impactos paralelos" es una teoría más reciente que propone que varios factores actúan simultáneamente para contribuir al desarrollo de esta enfermedad. Estos factores incluyen: la resistencia a la insulina, lipotoxicidad, los desequilibrios de citoquinas, la activación de la inmunidad innata, inflamación, componentes dietéticos con potencial proinflamatorio y alteraciones en las funciones microbianas intestinales^{79,85,86}.

Con inflamación, fibrosis y daño en las células del hígado, NASH se establece como la forma progresiva del MASLD. Los mediadores inflamatorios producidos por las células inmunitarias inducen la muerte en hepatocitos estresados cargados de lípidos, sensibilizándolos a la muerte celular mediada por citoquinas. Avances de esta condición puede progresar a cirrosis hepática y a hepatocarcinoma⁸⁷. En esta tesis nos centramos solamente en los primeros estadios de la enfermedad, la esteatosis hepática.

3.2.2 Diagnóstico y tratamiento terapéutico

La mayoría de los pacientes que padecen de MASLD, son asintomáticos. De este modo, su diagnóstico requiere más precisión. La prueba de diagnóstico considerada de referencia es la biopsia hepática. A través de la biopsia hepática, se puede evaluar el grado de contenido de grasa del hígado de una manera más precisa. Sin embargo, tiene factores limitantes tanto durante la toma de la muestra, con la posibilidad de sangrado y perforación y tras su extracción, con posibles errores de muestreo y variabilidad entre los observadores. Por estas razones se concluye que para proporcionar un diagnóstico preciso, este método se muestra invasivo. Como alternativa menos invasiva y más comúnmente utilizada para determinar el contenido de grasa hepática, se aplican los métodos de imágenes. Estos métodos pueden ser realizados a través de: resonancia magnética, que puede ser utilizada en dos modalidades, resonancia magnética con imágenes en fase y fuera de fase y la resonancia magnética por espectroscopia; fracción de grasa por densidad de protones (PDFF), que proporciona una estimación y clasifica la esteatosis hepática como leve, moderada o grave. Las mediciones de PDFF han demostrado utilidad por la capacidad de comparación con los resultados de la biopsia hepática para evaluar el grado de acumulación de grasa hepática⁸⁸.

Las primeras intervenciones están centradas en el cambio de estilo de vida con una adaptación en la dieta del individuo, recomendándose una dieta hipocalórica con pérdida de peso gradual, además de la inclusión de ejercicios físicos como parte del manejo del estilo de vida para pacientes con MASLD⁸⁹.

Actualmente, no existen muchas alternativas de tratamientos farmacológicos aprobados por la FDA para tratar MASLD. Sin embargo, se ha observado que el Resmetirom presenta resultados prometedores en ensayos clínicos actuando en los diferentes componentes de la enfermedad, incluyendo la esteatosis, la inflamación y la fibrosis⁹⁰. Además, el uso combinado de medicamentos está en análisis. Los estudios se están enfocando en diferentes vías de

señalización de esta enfermedad hepática. Se puede destacar, moduladores de la familia PPAR (receptores activados por proliferadores peroxisomales), agonistas de FXR (receptor farnesoide X), análogos de la familia FGF (factor de crecimiento fibroblástico), agonistas de THR- β (receptor beta de la hormona tiroidea), inhibidores de FASN (sintasa de ácidos grasos) y ACC (acetil-CoA carboxilasa), agonistas de GLP-1 (péptido similar al glucagón-1), inhibidores de GAL-3 (galectina-3), etc^{80,91}. Además, se puede incluir algunos medicamentos usados para la pérdida de peso, antidiabéticos y cardioprotectores para una mayor eficacia en el control de MAFLD al mejorar la composición corporal y la función hepática^{79,80}.

En algunos casos de pacientes con patología hepática desencadenada por MASLD y en un estado avanzado de deterioro con complicaciones graves, el trasplante de hígado se presenta como una alternativa. Sin embargo, el alto coste del trasplante y la escasez de donantes así como una serie de problemas como rechazo inmunológico tras el trasplante, hacen que esa alternativa no sea bastante viable⁸⁹.

3.3 ALTERACIONES METABÓLICAS EN LA PROGRESIÓN DE MASLD

3.3.1 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) contribuye a la patogénesis de MASLD debido a una reducción de la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo, pero principalmente en el tejido adiposo, proporcionando un incremento en la lipólisis y liberación de ácidos grasos. En otras palabras, la resistencia a la insulina promueve un aumento de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, provenientes de la lipólisis incrementada del tejido adiposo, que serán direccionados al tejido hepático contribuyendo a la acumulación de grasa en el hígado. Otra alteración en el tejido adiposo, es la baja síntesis de adiponectina en individuos con MASLD. Los bajos niveles de adiponectina van a alterar el metabolismo de los ácidos grasos y contribuir para el surgimiento de un estado inflamatorio crónico en el hígado^{92,93}.

Es importante resaltar que en una situación de RI, también hay una deficiencia en la absorción, síntesis, exportación y oxidación de los ácidos grasos libres en el hígado, llevando a la acumulación de grasa dentro de los hepatocitos. Con el hígado en condiciones de RI, la insulina no es capaz de suprimir la producción de glucosa hepática, lo que lleva a un aumento de la lipogénesis *de novo* (LDN) mediante la activación de la proteína de unión reguladora de esterol tipo 1 (SREBP1) y lo que exacerba la esteatosis hepática, promoviendo así la progresión de la MASLD. A pesar del notorio efecto de la RI en la promoción de la esteatosis hepática, la misma también puede ser considerada una de las causas de la resistencia a la insulina, ya que ambas patologías están fuertemente ligadas⁹³.

Otro factor que está directamente relacionado al estado de RI, es la activación aberrante de los macrófagos/células de Kupffer. En el hígado, los macrófagos están clasificados como: M1, o macrófagos proinflamatorios “clásicamente activados” y M2, o “alternativamente activados” macrófagos no inflamatorios. Estas células secretan mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral TNF- α y la interleucina IL-1 β , lo que genera un desequilibrio de la señalización hepática de la insulina, además de promover la inflamación y la fibrogénesis⁹⁴⁻⁹⁶.

3.3.2 Estrés del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo que se encuentra en el citoplasma de la célula, presente en alta cantidad en los hepatocitos. Este orgánulo tiene un papel esencial en diversas funciones metabólicas, como en la síntesis de lípidos y de proteínas, el plegamiento de proteínas secretadas y transmembranas y en la homeostasis del calcio. Sin embargo, cuando

hay una alteración en la homeostasis, se genera una acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas llevando al estrés del RE y a la activación de la respuesta de la proteína mal plegada (UPR - *unfolded protein response*)⁹⁷. Una respuesta necesaria realizada para restaurar la homeostasis. Sin embargo, el sistema UPR es un factor clave en la patogénesis de MASLD. Existen tres rutas de señalización canónicas de proteínas sensores de estrés que se activan durante la UPR: PERK (*PKR-like ER kinase*) la quinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplásmico iniciador de la traducción eucariota, IRE1 (*Inositol requiring enzyme 1 alpha*) la enzima dependiente de inositol, y ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) el factor de transcripción activante 6. En células no estresadas, estas rutas de señalización están inactivadas por la chaperona BiP/GRP78 (*binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78*) que se asocia a estos tres sensores^{97,98}.

Con la producción de un estrés celular, IRE1 interactúa con el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), resultando en los eventos de oligomerización y autofosforilación. A partir de estos dos procesos, IRE1 puede actuar como una quinasa o una ARNasa en las vías de señalización posteriores. La actividad quinasa de IRE1, puede estimular la vía JNK (quinasa C-Jun N-terminal), un regulador clave de las respuestas celulares al estrés y en la conducción de la apoptosis, o la vía de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas), un mediador del proceso inflamatorio. Sin embargo, la acción de IRE1 como una ARNasa promueve el empalme del ARNm de XBP1 (proteína 1 de unión a X-box), conduciendo a la transcripción de chaperonas y genes de degradación asociada al RE o ERAD (ER-associated protein degradation), determinantes para mantener la función del RE y la viabilidad celular⁹⁸⁻¹⁰⁰.

PERK, es una quinasa que fosforila eIF2 α (factor de iniciación eucariota 2 alfa), que enfrente al estrés del RE produce una respuesta citoprotectora, a través de una atenuación global de la síntesis de proteínas. Al mismo tiempo, PERK promueve la traducción de ATF4 (factor de transcripción 4), un factor de transcripción que regula los genes implicados en la respuesta al estrés del RE, como la proteína homóloga de C/EBP (CHOP). ATF4 transactiva genes implicados en: la homeostasis redox, el plegamiento de proteínas, la autofagia, el metabolismo de los aminoácidos y la apoptosis. Es un papel de extrema importancia, contribuyendo a la adaptación y la supervivencia celular en condiciones de estrés^{98,99}.

Terminada la disociación de la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), ATF6 se traslada al aparato de Golgi donde es escindida por proteasas, liberando el dominio citosólico ATF6f. En seguida, ATF6f entra en el núcleo celular para actuar como un factor de transcripción que modula positivamente los genes implicados en el plegamiento de proteínas del RE, respuesta inflamatoria, el metabolismo de los lípidos y la degradación asociada al RE^{99,101}.

3.3.3 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Las mitocondrias son orgánulos extremadamente importantes para el cuerpo y desempeñan un papel clave en el metabolismo. A través del consumo de alimentos se suministran a las células los nutrientes necesarios para su uso como combustible principal para la producción del ATP intracelular^{102,103}. Además de la producción intracelular de ATP, las mitocondrias son esenciales para la síntesis de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, colesterol y nucleótidos. Otras funciones importantes de las mitocondrias son la regulación de los procesos celulares, la oxidación de ácidos grasos, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), el mantenimiento de la homeostasis celular, la respuesta al estrés y el manejo de los desechos celulares^{102,104,105}.

El correcto funcionamiento de las mitocondrias es fundamental para la homeostasis del organismo. Por tanto, cualquier disfunción en la actividad mitocondrial puede poner en riesgo la homeostasis del organismo. Además, se observa que la disfunción mitocondrial frecuentemente va asociada al envejecimiento y a determinadas patologías como el cáncer, el síndrome metabólico y las enfermedades neurodegenerativas^{105,106}.

La oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos puede producir el estrés oxidativo (OxS), que también contribuye en la patogénesis de MASLD. Esta oxidación produce alteraciones estructurales y funcionales en el hígado causando un desequilibrio que conduce a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), dañando componentes celulares como lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. La oxidación de todo el ácido graso acumulado en el hígado conduce a un daño macromolecular, senescencia celular prematura y progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis, lo que en última instancia contribuye a la hepatocarcinogénesis. La activación de los macrófagos (células de Kupffer), por la exposición a ROS, generan especies reactivas de oxígeno adicionales, lo que provoca inflamación, lesión y fibrogénesis en el tejido hepático, lo que afecta a los hepatocitos y las células estrelladas hepáticas¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Una respuesta al estrés oxidativo, es la producción de una actividad antioxidante, regulada por la vía Nrf2/ARE. Esta vía es esencial para contrarrestar el daño inducido por OxS y restaurar el metabolismo normal de los lípidos, lo que la convierte en un objetivo potencial para prevenir y tratar MASLD^{107,111}.

3.3.4 Lipotoxicidad

La lipotoxicidad es el resultado de los efectos nocivos generados por la acumulación excesiva de ácidos grasos libres, triglicéridos, ceramidas y lipoproteína oxidada de baja densidad (oxLDL) en el hígado, contribuyendo al desarrollo de la esteatosis hepática. Eso se debe a la incapacidad del hígado de gestionar y exportar esos lípidos, abrumándose por una entrada excesiva de los mismos⁸⁶. Esta sobrecarga del aumento de los lípidos intrahepáticos genera la producción de metabolitos tóxicos como especies reactivas de oxígeno que causan, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, apoptosis y un daño hepático que contribuye a la progresión de la esteatohepatitis. Es importante resaltar que la composición/tipos de los ácidos grasos va a activar diferentes vías de señalización que consecuentemente producirán diferentes efectos dañosos al hígado¹¹². Se ha visto que la acumulación de los ácidos grasos saturados hepáticos (AGS) en el hígado contribuye más para el desarrollo de la resistencia a la insulina¹¹³.

Se sabe que individuos con MASLD presentan la lipogenesis *de novo* (LDN) elevada en comparación con individuos sanos. Eso se debe al desequilibrio de factores de transcripción como, la proteína de unión reguladora de esterol tipo 1 y 2 (SREBP-1, SREBP-2), la proteína de unión en respuesta a carbohidratos (ChREBP) y el receptor activado del proliferador del peroxisoma gamma (PPAR- γ) que conduce a un aumento de la lipogénesis *de novo* y la síntesis de triglicéridos, exacerbando el acumulo de grasa hepática⁸⁶.

La lipotoxicidad puede activar vías de inflamación por diferentes modos. La liberación de ácidos grasos libres, particularmente ácidos grasos insaturados como palmitato y estearato, son capaces de promover la inflamación hepática. Otra forma, es por la acumulación de colesterol, especialmente el colesterol libre, que estimula los macrófagos presentes en el hígado, ocasionando una inflamación crónica característica de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Como se ha mencionado anteriormente, existen diferentes tipos de lípidos que producen lipotoxicidad, sin embargo las ceramidas un tipo de esfingolípido, son muy relevantes en este proceso. Observadas en pacientes con NASH, las ceramidas se asocian con daño a los hepatocitos, por medio del estrés del RE, desequilibrio de la homeostasis de variados

compuestos y la activación de la apoptosis, lo que exacerba aún más la inflamación del hígado¹¹⁴.

3.3.5 Inflamación hepática

Aunque la inflamación sea un cuadro crónico presente en pacientes con NASH, existen numerosas evidencias del papel inicial de la inflamación en la patogénesis de la enfermedad del hígado graso metabólico asociado (MASLD). En la clínica, ya se sabe que individuos obesos son más propensos al desarrollo de MASLD. Además, un factor extremadamente asociado a la obesidad, es la inflamación crónica presente en estos individuos debido a una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo blanco¹¹⁵.

Otros factores estrechamente vinculados a la obesidad y la inflamación es la vía de respuesta de proteína desplegada (UPR) del estrés del retículo endoplasmático (ERS) y la resistencia a la insulina. Esto puede conducir a un aumento del estrés oxidativo y consecuentemente las respuestas inflamatorias. Las vías inflamatorias activadas en la obesidad son: JNK, IKK y NF- κ B. Al desencadenar la inflamación hepática, procesos dañosos van a conducir a la progresión de la enfermedad del hígado graso metabólico asociado MASLD¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Una de las principales rutas de señalización que culminan en el proceso inflamatorio es la ruta de señalización c-Jun N-terminal quinasa (JNK) proteína activadora 1 (AP-1), promotora de la liberación de señales proinflamatorias. Estudios demuestran que la activación de JNK puede contribuir a la inflamación del hígado de una forma compleja. Esta señalización puede ser activada tanto por el estrés del RE, como por la lipotoxicidad. Además su activación contribuye a la resistencia a la insulina y a la inflamación metabólica en la obesidad. Dentro del proceso de activación de la ruta JNK, vale destacar el papel de la citoquina TNF, que es un producto de la activación de la vía como un estimulante de la misma¹¹⁹⁻¹²¹. Curiosamente, se ha visto que el ejercicio físico es capaz de inhibir la activación de JNK en ratones con MASLD, potencialmente mediante la modulación del MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) hepático endógeno, reduciendo así la lipotoxicidad y sus efectos inflamatorios.

Otra ruta importante en el proceso inflamatorio es la ruta de señalización del factor nuclear κ B (NF κ B)-IkB quinasa (IKK). Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación sistémica desempeña un papel importante en la progresión de MASLD. Esta inflamación desencadena la activación hepática de NF- κ B a través del complejo IKK (formado por las subunidades catalíticas IKK α e IKK β , unido con la subunidad reguladora NEMO). El complejo IKK participa en la inducción de niveles elevados de colesterol LDL en plasma (relacionados con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica) y de la esteatosis simple^{122,123}. Como en la ruta JNK, la inhibición de la actividad transcripcional nuclear de NF- κ B, también suprime la inflamación y previene la progresión de MASLD simple a NASH¹²⁴.

Además de la activación de variadas vías de señalización, complejos proteicos y proteínas independientes están involucrados en el proceso inflamatorio en el hígado. El complejo multiproteico, denominado inflamósoma, es responsable por detectar señales de daño intracelular. El inflamósoma más estudiado, es el NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*). El inflamósoma NLRP3, mediante la activación de la caspasa-1, conduce al procesamiento de citocinas proinflamatorias como IL1 β e IL18. Un proceso importante desencadenado por NLRP3 es la piroptosis. Es un proceso de muerte celular lítica que libera factores inflamatorios y contribuye para la inflamación del hígado, además de estimular la activación de las células estrelladas, amplificando la fibrosis hepática^{125,126}. Algunas proteínas, como los antagonistas de quimioquinas (CCL2, CCL3 y CCL5), van a regular la inflamación hepática a través del reclutamiento de células inmunitarias, así como el tráfico de células

inmunitarias innatas en la homeostasis. Sin embargo, las quimiocinas no modulan solamente las funciones de las células no inmunes. Son capaces de modular las células estrelladas hepáticas, lo que contribuye a la inflamación del hígado en afecciones como MASLD^{127,128}.

El componente clave de todo el proceso inflamatorio, tanto agudo como crónico son los macrófagos. Existen dos tipos principales de macrófagos implicados en el proceso inflamatorio hepático. Son las células de Kupffer que se originan a partir de progenitores eritromieloides derivados del saco vitelino en el hígado fetal y los macrófagos derivados de monocitos, que se reclutan a partir de monocitos circulantes. Los monocitos circulantes reclutados son capaces de diferenciarse en macrófagos de tipo M1 (proinflamatorios) o M2 (antiinflamatorios). Los macrófagos M1 son inducidos por estímulos provenientes de los ácidos grasos libres (AGL) a través de TLR, del lipopolisacárido (LPS), de la leptina a través del receptor de leptina, del colesterol y de las lipoproteínas oxidadas de baja densidad (oxLDL) a través de receptores específicos como CD36 y SRA. En las citocinas proinflamatorias producidas por los macrófagos M1 están incluidas el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina-1 beta (IL1 β) y la interleucina-6 (IL6), para mantener la homeostasis de los neutrófilos. El otro grupo de macrófagos, los M2 son inducidos por factores del microambiente que generan una respuesta antiinflamatoria como, la interleucina-4 (IL4) y la interleucina-13 (IL13). Estos macrófagos exhiben un fenotipo antiinflamatorio y secretan interleucina-10 (IL10), que puede inducir selectivamente la muerte celular en macrófagos M1, que expresan niveles altos de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)¹²⁹⁻¹³¹.

3.3.6 Apoptosis y necrosis

La apoptosis, también definida como muerte celular programada, es una vía de autodestrucción producida de forma ordenada y controlada, que ejerce un papel determinante en la progresión de MASLD y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Esta muerte programada de los hepatocitos se observa comúnmente en modelos experimentales de esteatohepatitis y en los pacientes con MASLD. Esta inducción puede ser impulsada por determinados factores como las caspasas, quinasa C-Jun N-terminal (JNK) y por las proteínas de la familia Bcl-2. Además, disfunciones en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, así como en la microbiota, promueven la apoptosis, acelerando la progresión de MASLD/NASH^{132,133}.

El proceso de apoptosis celular puede ser desarrollado por dos vías principales, la extrínseca (mediada por receptores de muerte) y la intrínseca (iniciada por orgánulos). La actividad de estas dos vías está involucrada en la patogénesis de MASLD. Además, es importante destacar que factores como la disfunción mitocondrial, el estrés del RE y la permeabilización lisosomal contribuyen a la muerte celular. La liberación de factores de la apoptosis de los hepatocitos moviliza las células inmunes, células estrelladas hepáticas y el depósito de colágeno tipo 1 por parte de los miofibroblastos hepáticos. Sin embargo, este reclutamiento desencadena mecanismos regenerativos para sustituir los hepatocitos muertos, pero las respuestas de reparación aberrantes pueden provocar la progresión de la lesión hepática¹³²⁻¹³⁴.

Un evento que se desencadena posteriormente a la apoptosis celular es la necrosis. Se ha observado niveles elevados de TNF- α en pacientes con MASLD. Se sabe que el TNF- α desempeña un papel crucial en la promoción de la inflamación y de las lesiones hepáticas. Esto directamente contribuye para la progresión de MASLD a etapas más graves. Eso se debe al aumento de la muerte de las células hepáticas, lo que puede provocar necrosis dentro del hígado¹³⁵.

3.3.7 Fibrosis

El desarrollo de la fibrosis generalmente comienza a aparecer en individuos con MASLD a medida que la enfermedad progresa desde una simple esteatosis hepática hasta una esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y en casos más graves, hasta la fibrosis hepática y cirrosis. Además de factores como la acumulación de triglicéridos hepáticos, el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina, las sustancias lipotóxicas y la inflamación, los polimorfismos genéticos también pueden contribuir al desarrollo de fibrosis en MASLD. La susceptibilidad a la fibrosis hepática durante el desequilibrio metabólica en la esteatosis hepática puede aumentar con los polimorfismos genéticos como, PNPLA3, TM6SF2 y HSD17B13. Con la disfunción hepática y la actividad de células inflamatorias, señales son liberados para activación de las células estrelladas hepáticas, promoviendo repuestas fibrogénicas y conducir a fibrosis y cirrosis^{134,135}.

4 EL TEJIDO ADIPOSO

El organismo, a través del tejido adiposo regula varios aspectos de su fisiología como, la ingesta de alimentos, los niveles de energía, la sensibilidad a la insulina, la temperatura corporal y las respuestas inmunes¹³⁶. Eso es posible debido a una peculiaridad de este tejido, la presencia de tres tipos distintos de tejido adiposo. Estos adipocitos se diferencian especialmente de acuerdo con su color, actividad metabólica, distribución y vascularización (Imagen 4). Los tejidos son conocidos como, adiposo blanco, adiposo beige y adiposo marrón.

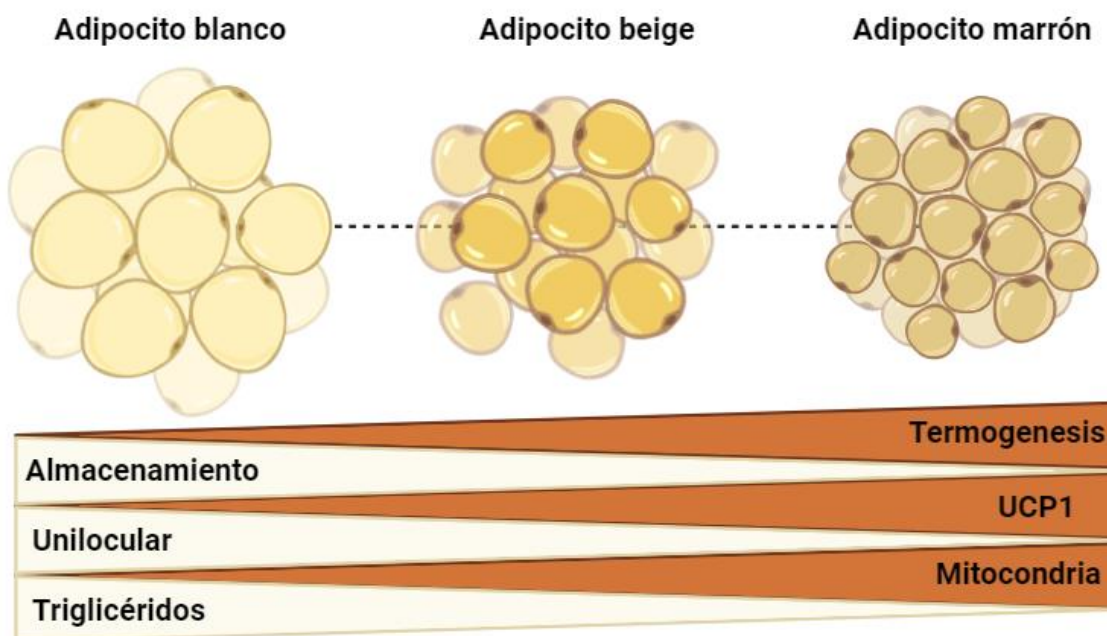


Imagen 4. Tipos de tejido adiposo y las diferencias morfológicas y funcionales entre ellos (elaboración propia, mediante Biorender).

transformarse estructural y metabólicamente y desdiferenciarse para diversas funciones¹³⁷. El tejido adiposo blanco (TAB), se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo de los individuos adultos. Este tejido puede ser del tipo visceral, ubicado alrededor de los órganos internos o del tipo subcutáneo. Además, este tejido está compuesto por varias células como los adipocitos, preadipocitos, macrófagos y células endoteliales¹³⁷⁻¹³⁹. TAB contribuye significativamente en los procesos inflamatorios y principalmente en el metabolismo energético. Sirve como órgano de almacenamiento de energía, almacena triglicéridos y libera ácidos grasos a través de procesos como la lipogénesis y la lipólisis^{138,140}. El TA beige surge principalmente de células progenitoras Myf5 y existe en la grasa subcutánea y visceral. Funciona como un tipo de adipocitos termogénicos que disipan energía en forma de calor, lo que ayuda a combatir la obesidad y sus trastornos asociados. Pueden activarse mediante estrés por frío o agonistas de los receptores adrenérgicos β_3 , lo que lleva a la inducción de genes termogénicos y a un aumento de la termogénesis. La activación de los adipocitos beige puede mejorar la tolerancia sistémica a la glucosa y ayudar en el tratamiento de la obesidad y la diabetes¹³⁸. El TAM (marrón o pardo) disipa energía en forma de calor, ofreciendo una nueva forma de combatir la obesidad y los trastornos asociados. Se caracteriza por una alta actividad termogénica y enriquecimiento de UCP1, que desacopla la oxidación del combustible de la síntesis de ATP¹⁴⁰. La grasa marrón desempeña un papel crucial en la termogénesis, la promoción de la absorción de glucosa y la eliminación de triglicéridos de la circulación. La activación del tejido adiposo marrón a través de la exposición al frío aumenta la movilización de lípidos y promueve la quema de lípidos mediante la producción de calor en las mitocondrias¹³⁸.

4.1 TEJIDO ADIPOSEO BLANCO

El tejido adiposo blanco (TAB) tiene como principal función, servir de depósito de energía para otros tejidos. Actúa como un sumidero metabólico para el exceso de ingesta de alimentos. Sin embargo, es un órgano secretor que libera adipocinas, que regulan la hipertrofia, la hiperplasia y la actividad de los adipocitos. Asimismo, TAB sintetiza y secreta hormonas como la leptina y la adiponectina, que se dirigen a los músculos y al hígado para utilizar la glucosa y los ácidos grasos de manera eficiente. Morfológicamente, TAB se caracteriza por presentar gotas lipídicas uniloculares, menor vascularización y menor cantidad de mitocondrias en comparación con los demás tipos de tejido adiposo^{141,142}.

Como ya se ha mencionado, este tejido se distribuye por todo el cuerpo con dos depósitos principales, TAB subcutáneo y TAB visceral. El TAB visceral, se encuentra en la cavidad abdominal y se divide a su vez en depósitos mesentérico, omental, perirrenal y peritoneal. Otra característica notable del tejido adiposo blanco es su capacidad de aumentar de tamaño a través de hipertrofia e hiperplasia, reguladas por factores secretores liberados por este mismo tejido. Las adipocinas liberadas por TAB desempeñan un papel en la regulación de la expansión de los adipocitos, influyendo en el metabolismo del sustrato y la actividad de los adipocitos. Factores como la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la hiperglucemia y las enfermedades cardiovasculares pueden afectar la fisiología de TAB, lo que provoca cambios en el tamaño del tejido adiposo^{141,142}.

4.1.1 Metabolismo lipídico en el adipocito

Los adipocitos blancos almacenan energía en forma de triglicéridos (TG) en una sola gota de lípidos grande y tienen pocas mitocondrias. Estos triglicéridos pueden ser hidrolizados a AG para la liberación al torrente sanguíneo. El metabolismo de los lípidos en los adipocitos

blancos implica un proceso enzimático secuencial, la lipólisis, donde los TGs almacenados se hidrolizan para liberar ácidos grasos libres (AGL) para diversos fines¹⁴³.

Antes de la llegada a los adipocitos blancos, la enzima lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos transportados por los quilomicrones, liberando ácidos grasos para la absorción en los adipocitos. Al facilitar la absorción de ácidos grasos de los quilomicrones, la LPL influye en el recambio general de lípidos y en la capacidad de almacenamiento de los adipocitos. La actividad de la LPL es esencial para regular el metabolismo de los lípidos y el equilibrio energético en el tejido adiposo¹⁴⁴. Una vez en contacto con la membrana celular, los ácidos grasos son transportados para el interior de la célula por la acción de CD36. Esto permite la absorción de AG de cadena larga. La inhibición de la translocación de CD36 por las ceramidas puede provocar una alteración de la tolerancia a la glucosa y la absorción de ácidos grasos, lo que afecta la salud metabólica general¹⁴⁵. Ya en el interior de los adipocitos, los AGs son esterificados a TG para su almacenaje. Sin embargo, los propios adipocitos pueden producir el AG a partir de la glucosa.

La glucosa proveniente de la circulación, ingresa al adipocito a través de transportadores de glucosa como GLUT4 sensible a insulina y GLUT1, no sensible a insulina. Esta síntesis de AGs será obtenida a través del proceso de lipogénesis. Al pasar por los transportadores, la glucosa se metaboliza mediante la glucólisis y el ciclo del TCA para producir moléculas de citrato. Además, en este proceso la glucosa se convierte en glicerol-3-fosfato (G3P). En otras palabras, la glucosa proporciona el sustrato para la síntesis de ácidos grasos, promoviendo la lipogénesis *de novo* mediante la estimulación de la insulina. La insulina activa enzimas lipogénicas y factores de transcripción como SREBP1 y ChREBP, cruciales para la síntesis de lípidos. Con la formación del citrato, la ATP citrato liasa (ACLY) y la acetil-CoA carboxilasa (ACC1) generan acetil-CoA. El acetil-CoA se transporta a las mitocondrias para generar malonil-CoA, un componente clave para la síntesis de ácidos grasos. Una vez formado el malonil-CoA, la ácido graso sintasa (FAS), irá utilizarlo para producir ácido palmítico. Vale destacar que el acetil-CoA también puede provenir de la conversión de acetato por la acil-CoA sintetasa ACSS2. Enzimas como la ácido graso sintasa (FAS) y la acetil-CoA carboxilasa (ACC) son esenciales para el alargamiento y la desaturación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos recién sintetizados se incorporan a los triglicéridos para su almacenamiento (TG *pool*) o se utilizan como moléculas de señalización en el metabolismo del tejido adiposo^{144,145}.

En condiciones de hipoglucemia, frío o durante la práctica de ejercicios, la lipólisis se activa en los adipocitos para la generación de ácidos grasos y glicerol. Los reguladores hormonales como las catecolaminas, los péptidos natriuréticos y la insulina estimulan la lipólisis en los adipocitos humanos. Los receptores beta-adrenérgicos desempeñan un papel crucial en la activación de la lipólisis durante períodos de alta demanda energética, como en ayuno o en la exposición al frío¹⁴⁶. Cuando son estimulados por catecolaminas como la noradrenalina, los receptores beta-adrenérgicos inician una cascada que eleva los niveles de AMP cíclico, lo que lleva a la activación de la proteína quinasa A (PKA), que modula la lipólisis. La fosforilación de factores clave como PLIN1 por PKA permite la liberación de CGI58, que luego interactúa con ATGL para activar completamente su actividad de triglicérido hidrolasa. ATGL, codificada por PNPLA2, es la principal enzima responsable de descomponer el triacilglicerol (TAG) en diacilglicerol (DAG) durante la lipólisis. La actividad de ATGL está regulada por proteínas que interactúan como CGI58 (ABHD5), que es esencial para la activación completa de ATGL durante la lipólisis estimulada. Se ha visto que la deficiencia de ATGL puede provocar la acumulación de TG en el tejido adiposo tanto en ratones como en humanos¹⁴³.

Igualmente a ATGL, la lipasa sensible a hormonas HSL va a descomponer los triacilgliceroles en ácidos grasos individuales. Cuando se activa por la vía de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc, la HSL se traslada a las gotitas de lípidos con la ayuda de perilipina para una lipólisis eficiente¹³⁸. HSL es responsable de la hidrólisis de diglicéridos a monoglicéridos durante el proceso lipolítico en los adipocitos. El DAG se descompone aún más mediante la lipasa sensible a hormonas (HSL) para liberar un ácido graso y G3P, que es un intermediario crucial en el metabolismo energético. Por otro lado, la deficiencia global de HSL en ratones conduce a una ligera disminución de la hidrólisis de triglicéridos y a un aumento de la masa de tejido adiposo marrón, lo que indica efectos compensatorios de otras lipasas. El papel de HSL se muestra de gran importancia, por estar directamente involucrado en la formación final de los ácidos grasos y glicerol. HSL promueve la hidrólisis de los TG para generar monoacilglicerol (MG) y como consecuencia, la liberación de glicerol y ácidos grasos, componentes esenciales para el metabolismo energético. Finalmente, los dos compuestos son liberados para la circulación y destinados a otros tejidos periféricos (Imagen 5)^{144,146}.

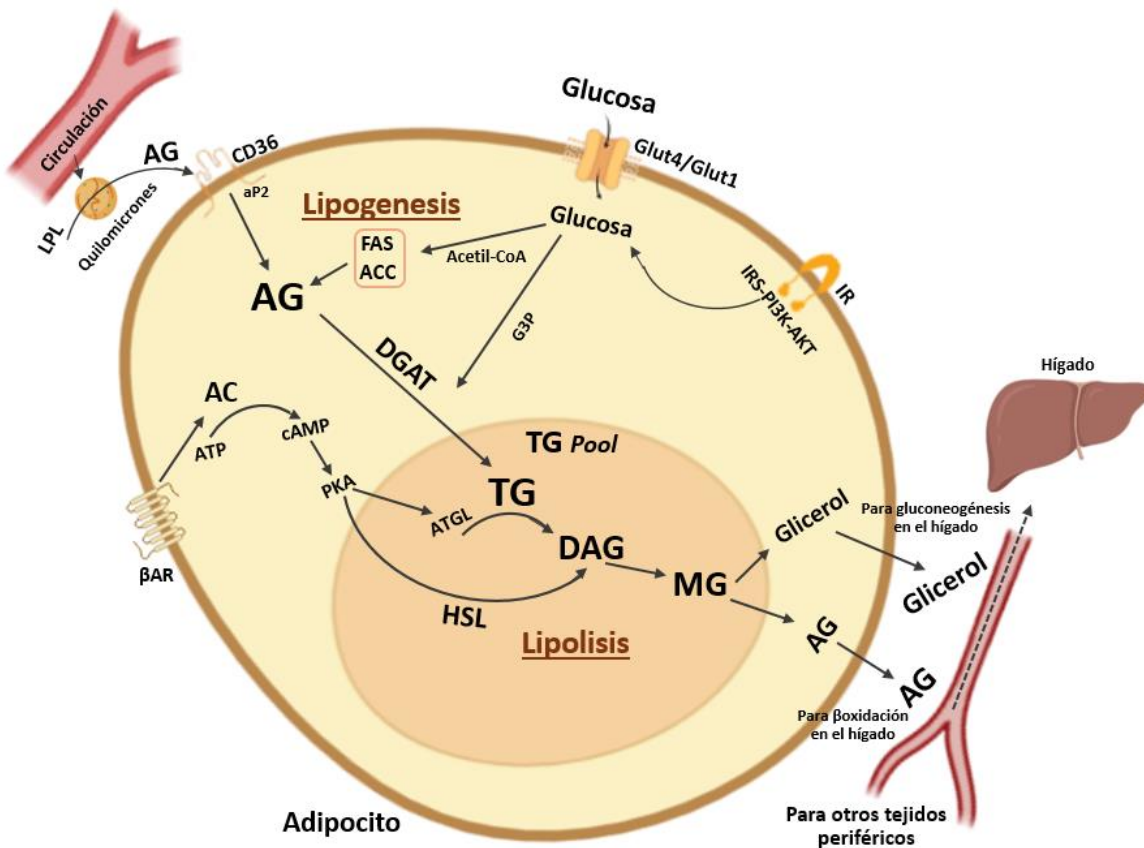


Imagen 5. Esquema del metabolismo lipídico en los adipocitos blancos (elaboración propia, mediante Biorender). AG = ácidos grasos, TG = triglicéridos, IR = receptor de insulina, DAG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol

4.1.2 Metabolismo de la glucosa en el adipocito

El metabolismo de la glucosa, especialmente la glucólisis, en los adipocitos blancos es crucial para mantener la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de todo el cuerpo, como lo demuestra la correlación positiva entre las enzimas lipogénicas del tejido adiposo y la sensibilidad a la insulina. Como mencionado anteriormente, la glucosa se metaboliza en los adipocitos para producir moléculas de citrato necesarias para la LDN, lo que destaca el papel

de la glucosa en la generación de especies lipídicas esenciales para el control metabólico sistémico¹⁴⁴.

La glucólisis tiene un papel crucial en la producción y almacenamiento de energía en los adipocitos blancos. Durante el proceso de glucólisis, parte de la glucosa se convierte en glicerol-3-fosfato (G3P), que constituye la columna vertebral del triacilglicerol. Terminada la glucólisis, la glucosa puede oxidarse en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para producir energía o convertirse en ácidos grasos mediante lipogénesis *de novo*. Algunas proteínas y enzimas son fundamentales en el metabolismo de la glucosa. La proteína de unión a elementos sensible a los carbohidratos (ChREBP) desempeña un papel en la regulación de las enzimas lipogénicas y los factores de transcripción, lo que influye en el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Otras enzimas, como las enzimas glucolíticas como la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa, también participan en la vía glucolítica¹⁴⁴.

4.2 TEJIDO ADIPOSO BEIGE

El tejido adiposo beige juega un papel crucial en la regulación del equilibrio energético a través de la termogénesis, pero participa también, en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en órganos periféricos. Otra función del tejido adiposo beige es la remodelación del tejido adiposo, que incluye procesos como la fibrosis tisular y la angiogénesis. Algunas moléculas secretoras liberadas por el tejido adiposo beige, tienen efectos endocrinos y también pueden funcionar de manera paracrina/autocrina para mediar la comunicación entre células dentro del propio tejido adiposo¹⁴⁷.

El tejido adiposo beige se encuentra predominantemente en los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (TAB). Este tejido también puede ubicarse en el cuello y en la región subescapular, similar a TAM, destacando su presencia en regiones anatómicas específicas del cuerpo. Estudios han demostrado que los adipocitos beige pueden desarrollarse dentro del TAB subcutáneo a partir de un subconjunto distinto de preadipocitos o mediante la transdiferenciación de adipocitos blancos existentes, lo que indica su capacidad para formarse en diferentes entornos de tejido adiposo¹⁴⁸.

Los adipocitos beige poseen características únicas en comparación con los adipocitos blancos y marrones. Participan en la disipación de energía en forma de calor, contribuyendo a la homeostasis energética de todo el cuerpo y a la homeostasis de la glucosa a través de mecanismos independientes de UCPI¹⁴⁷. El tejido beige se puede inducir en los depósitos de tejido adiposo blanco (TAB), contribuyendo al proceso conocido como “*browning*” o “*amarronamiento*” del TAB, que puede ayudar en el gasto de energía y la salud metabólica. Los adipocitos beige pueden reclutarse en respuesta a diversos estímulos ambientales, como por ejemplo la aclimatación al frío. Este reclutamiento puede ocurrir incluso en individuos que previamente no tenían niveles identificables de adipocitos termogénicos, lo que demuestra la naturaleza adaptativa de la grasa beige¹⁴⁸.

El tejido adiposo beige contribuye a la termogénesis al expresar la proteína *Uncoupling Protein 1* (UCPI), que desacopla la fosforilación oxidativa para generar calor, similar a los clásicos adipocitos marrones. Los adipocitos beige expresan varios marcadores como UCPI, PGC1 α y Cidea, junto con marcadores selectivos de color beige como Cd137, Tbx1, Tmed26 y Cited1, lo que los distingue de otros tipos de adipocitos y resalta sus características fisiológicas únicas¹⁴⁹.

Las mitocondrias de los adipocitos beige, similares a los adipocitos marrones, carecen de control respiratorio y exhiben una fuga de protones mediada por UCPI, lo que contribuye significativamente a la tasa metabólica basal. El reclutamiento y la activación de los adipocitos beige por parte de diversos reguladores y señales ambientales impactan positivamente el gasto

energético de todo el cuerpo, protegen contra el aumento de peso inducido por la dieta y mejoran la sensibilidad a la insulina, lo que contribuye a la salud metabólica general. Debido a sus propiedades descritas, el tejido adiposo beige es un objetivo terapéutico atractivo para la obesidad y afecciones relacionadas, como la diabetes tipo 2, lo que destaca su potencial en el manejo de los trastornos metabólicos^{149,150}.

4.3 TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

El tejido adiposo marrón (TAM) es un tipo especial de tejido adiposo que ayuda en el gasto calórico a través de la producción de calor para manutención de la temperatura corporal. Además, el tejido adiposo marrón contribuye significativamente a la homeostasis de la glucosa y de la insulina al ayudar en la captación y utilización de la glucosa¹⁵¹.

El tejido adiposo marrón se encuentra en ubicaciones discretas en los humanos, incluida la región cervical-supraclavicular, el área perirrenal/suprarrenal y las regiones paravertebrales alrededor de los vasos principales como la aorta y sus ramas¹⁵². La presencia de TAM se puede visualizar en humanos adultos mediante una tomografía por emisión de positrones con 2-desoxiglucosa marcada con 18 flúor (18 FDG-PET). La cantidad de TAM se correlaciona inversamente con el índice de masa corporal (IMC) y la adiposidad, lo que indica su papel en el equilibrio energético y el metabolismo¹⁵³.

El TAM activo, puede contribuir hasta entre un 2% y un 5% de la tasa metabólica en reposo en humanos, lo que destaca su importancia en el gasto energético y la termogénesis. TAM está enriquecido con mitocondrias y morfológicamente este tejido se caracteriza por tener múltiples pequeñas gotas de lípidos en el citoplasma, lo que lo distingue de los adipocitos blancos que normalmente tienen una gran gota de lípidos por célula¹⁵¹.

El tejido adiposo marrón está especializado en disipar energía química en forma de calor como un mecanismo de defensa contra el frío y la alimentación excesiva. TAM exhibe una flexibilidad extrema en la selección de combustible, utilizando una amplia gama de metabolitos para apoyar la termogénesis, lo que lo convierte en un tejido único e importante en el balance energético. Este tejido utiliza diversos sustratos energéticos como lípidos, glucosa, succinato, lactato y aminoácidos de cadena ramificada para generar calor y mantener la homeostasis metabólica. Todo eso es posible debido a su capacidad de producir calor a través de la proteína desacopladora 1 específica de la grasa marrón (UCP1) en las mitocondrias¹⁵⁴.

Cuando hay una exposición al frío, la ingesta de alimentos o la práctica de ejercicios físicos, consecuentemente hay un estímulo para la liberación de norepinefrina por el sistema nervioso central. La norepinefrina puede unirse al receptor adrenérgico β_3 ubicado en la membrana de los adipocitos marrones, activando vías de señalización posteriores. Con la estimulación de los receptores beta adrenérgicos, se genera la activación de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), lo que por fin provoca la activación de la proteína quinasa A (PKA). PKA tiene como papel, incrementar el proceso de lipólisis, a través de la activación de proteínas como HSL y ATGL. Estas proteínas actúan sobre los triglicéridos almacenados en el citosol provocando la liberación de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos son esenciales para la activación de UCP1 en el tejido adiposo marrón, ya que son un sustrato importante para el proceso termogénico. UCP1 disminuye el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo que lleva a la disipación de energía en forma de calor en lugar de producción de ATP. Al desacoplar la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP, UCP1 promueve la oxidación de ácidos grasos y glucosa para generar calor, un proceso conocido como termogénesis sin temblores¹⁵⁵. Vale destacar que TAM puede manejar eficientemente un alto nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo

que en realidad promueve su termogénesis, a diferencia de la mayoría de las células donde las ROS perjudican la función mitocondrial¹⁵⁶.

Existe una regulación a nivel genético de la proteína UCP1 mediada por múltiples factores de transcripción, como FGF21, Prdm16, PPAR γ y PGC1 α . FGF21 juega un papel crucial en la inducción de la proliferación del tejido adiposo marrón y en la promoción de la termogénesis en el tejido adiposo. FGF21 mejora la termogénesis al regular positivamente el coactivador PGC1 α después de la exposición al frío o el ejercicio, aumentando así la termogénesis en el tejido adiposo. Además, FGF21 también induce el “amarronamiento” de los adipocitos blancos mediante la activación de PPAR γ en TAB, lo que conduce a la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos marrones maduros, mejorando aún más la termogénesis¹⁵⁷. Prdm16 es un otro factor de transcripción crucial para regular el programa de genes termogénicos en adipocitos marrones y beige. Se ha visto que Prdm16 es prescindible para el desarrollo embrionario de TAM, pero es esencial en ratones jóvenes para suprimir la expresión de genes selectivos de grasa blanca en TAM. La pérdida de Prdm16 conduce a una grave disminución del carácter termogénico del tejido adiposo marrón interescapular en ratones adultos, lo que provoca una disfunción del TAM y sensibilidad al frío sin predisponer a los animales a la obesidad¹⁵⁸. Uno de los reguladores transcripcionales de la termogénesis más importante es PPAR γ . PPAR γ es esencial para mantener la función de los adipocitos marrones y su inducibilidad ante diversos estímulos como tiazolidinedionas, AMPc o señales β -adrenérgicas, tanto *in vitro* como *in vivo*. PPAR γ desempeña un papel crucial en la regulación de la glicerol quinasa (GYK), un objetivo conocido de PPAR γ , que participa en la esterificación de ácidos grasos proporcionando glicerol-3-fosfato (G3P) como sustrato. La expresión reducida de GYK debido a la pérdida de PPAR γ conduce a una disminución de la síntesis de triacilglicerol y del almacenamiento de lípidos en los adipocitos marrones. Además, PPAR γ puede compensar la pérdida de PPAR α para regular la función termogénica de los adipocitos marrones, lo que indica su importante papel en el mantenimiento de la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón¹⁵⁹. PPAR γ se caracteriza por presentar coactivadores con los que se asocia. Uno de los coactivadores es PGC1 α (coactivador tipo 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas). Se considera el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial, controlando el contenido mitocondrial y la respiración. PGC1 α es esencial para activar el programa de expresión génica que genera termogénesis en respuesta a estímulos ambientales como el frío. Cuando los adipocitos marrones se activan mediante señalización β -adrenérgica, el promotor PGC1 α sufre modificaciones de histonas que permiten la inducción de la transcripción de PGC1 α y el programa termogénico. La ausencia de PGC1 α en los adipocitos marrones conduce a una incapacidad para activar el programa de expresión del gen termogénico en respuesta al frío, lo que resulta en una mayor sensibilidad al frío¹⁶⁰.

El tejido adiposo marrón desempeña un papel crucial en contrarrestar la sobrecarga de lípidos hepáticos al coordinar la oxidación del exceso de ácidos grasos. TAM ayuda a almacenar ácidos grasos como triglicéridos en el tejido adiposo blanco, evitando así la acumulación excesiva de lípidos en el hígado. Al facilitar la oxidación del exceso de ácidos grasos, TAM contribuye a mantener la homeostasis energética sistémica, esencial para prevenir las alteraciones metabólicas asociadas a MASLD¹⁶¹.

La comunicación entre el hígado y el tejido adiposo es fundamental para mantener la homeostasis sistémica de los lípidos y de la glucosa, lo que da soporte al control de la homeostasis energética del organismo. Por otra parte, el consumo excesivo de alimentos y el desarrollo de la obesidad puede promover una comunicación disfuncional entre el tejido hepático y el tejido adiposo. Una alteración comprobada en la obesidad, es la disfunción del tejido adiposo blanco caracterizada por un aumento de la deposición de grasa (adiposidad) y una inflamación crónica de bajo grado. En consecuencia, aumenta la entrega de lípidos y adipocinas al hígado, permitiendo el desarrollo de la esteatosis hepática y de la inflamación a largo plazo^{162,163}.

5.1 LA INTERCOMUNICACIÓN EN UN ESTADO FISIOLÓGICO

5.1.1 Metabolismo de lípidos

El hígado gestiona el equilibrio del metabolismo de los lípidos a través de vías como la absorción de lípidos circulantes, la lipogénesis *de novo* (LDN), la oxidación de ácidos grasos (FAO) y de la exportación de lípidos como partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Para mantener la homeostasis de los lípidos en el hígado, la adquisición y la eliminación son cruciales. Inicialmente, la absorción de los ácidos grasos (AG) circulantes se ve posible por la actividad de los transportadores específicos de lípidos, presentes en la membrana plasmática de los hepatocitos. Todo el proceso de transporte para el citoplasma celular es regulado por PPAR γ y el transporte para los diferentes compartimientos celulares se da por la acción de FABP1.

La leptina juega un importante papel en el control de la lipogénesis *de novo* y de la oxidación de los lípidos ya que es la principal hormona encargada de controlar el proceso metabólico en el hígado, aunque la adiponectina también actúe activamente en este proceso. Los niveles circulantes de leptina están directamente relacionados con, el tamaño del tejido adiposo blanco, con la oscilación circadiana y con el estado nutricional del organismo. Aunque la leptina actúa directamente en el hígado, esta hormona tiene una función crucial en el cerebro, por informar sobre el almacenamiento de energía disponible y que consecuentemente irá modular el comportamiento del individuo en el consumo o no de alimentos. En concordancia con esto, se sabe que durante la alimentación o en condiciones de obesidad los niveles de leptina circulantes aumentan mientras en un estado de ayuno o pérdida de peso su concentración plasmática disminuye¹⁶⁴.

Tras la liberación de la leptina y de la adiponectina por los adipocitos blancos subcutáneos, estas hormonas se dirigen al hígado donde se unen respectivamente a sus receptores de leptina (LepRb) y de adiponectina (AdipoR1). A través de la activación de AMPK y de PPAR α , la leptina juntamente con la adiponectina irá disminuir la lipogénesis hepática y aumentar la oxidación. La fosforilación de AMPK en pAMPK posibilita su actividad en la inhibición de la lipogénesis, suprimiendo la expresión de SREBP1c y fosforilando la acetil CoA carboxilasa-1 (ACC-1), una enzima limitante de la velocidad de la lipogénesis *de novo*¹⁶². Como consecuencia de la baja actividad de ACC-1, la producción de malonil CoA se limita. De esta forma, se aligera la inhibición de la actividad de la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y se mejora el transporte de los ácidos grasos hacia las mitocondrias para el proceso de β -oxidación. La oxidación de los ácidos grasos es un proceso esencial y está controlado por PPAR α que reduce los niveles de lípidos intrahepáticos mediante su uso como fuente de energía. Además, los niveles de FAS se quedan bajos debido a la limitación de la lipogénesis *de novo*⁴⁷. Independientemente de la actividad de AMPK, la adiponectina reduce la acumulación de ceramida hepática generando una mejora de la actividad de la ceramidasa en el hígado. El

último mecanismo utilizado por el hígado para mantener los niveles estables de grasa intrahepática es la exportación de los mismos empaquetándolos en partículas VLDL, que luego pueden utilizarse o almacenarse en otros tejidos. El funcionamiento equilibrado de las vías de señalización, evitan que haya un incremento de la actividad de la lipogénesis *de novo*, frenando el acúmulo de grasa hepática.

5.1.2 Metabolismo de la glucosa

Paralelamente al control del metabolismo lipídico, el mantenimiento sistémico de la homeostasis de la glucosa se ocurre gracias la comunicación del tejido hepático con el tejido adiposo. Un tejido adiposo sano y completamente funcional ayuda a mantener la sensibilidad sistémica a la insulina, ya que produce una mejora en la absorción de glucosa por los tejidos periféricos y al mismo tiempo disminuyen la producción de glucosa hepática¹⁶². El tejido hepático es responsable por la producción de FGF21, una importante hepatocina ya mencionada en esta tesis. Estudios demuestran que esta hormona estimula la secreción rápida y robusta de adiponectina en roedores, tanto *in vivo* como en modelos *in vitro*. Además, la administración de FGF21 es capaz de estimular los adipocitos blancos y producir un aumento significativo de los niveles de adiponectina circulante en cuestión de pocos minutos y una elevación prolongada hasta 2 horas tras su administración. Sin embargo, los efectos glucémicos y de sensibilización a la insulina del FGF21, incluyendo niveles reducidos de glucosa en sangre y mayor sensibilidad a la insulina, dependen de la presencia de adiponectina funcional. Eso enfatiza la importancia de la interacción FGF21-adiponectina en la regulación metabólica. La adiponectina tiene un papel determinante en la activación de vías responsables por la homeostasis de la glucosa en el hígado¹⁶⁵.

Tras la activación de la adiponectina vía FGF21, esta hormona secretada por los adipocitos va a actuar sobre sus receptores AdipoR1 estimulando la vía AMPK. Como consecuencia, AMPK actúa inhibiendo la transcripción de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa), lo que conduce a la disminución de la gluconeogénesis. Esta acción resulta en una disminución de la producción de glucosa y mejora la glucemia.¹⁶⁶ Además, está indicado que los niveles más altos de adiponectina están relacionados con una mejor sensibilidad a la insulina, mientras que los niveles más bajos están relacionados con la resistencia a la insulina. Vale destacar que niveles elevados de adiponectina reducen significativamente la producción de glucosa en el hígado, por otro lado la degradación de la vía de señalización de la adiponectina contribuye a una alta producción de glucosa en el hígado, lo que conduce a la hiperglucemia^{167,168}. Se ha visto en estudios clínicos, que las inyecciones de adiponectina en individuos con diabetes tipo 1 y tipo 2, pueden reducir los niveles de glucosa en plasma sin causar hipoglucemia¹⁶⁷. Otro papel de la adiponectina en la homeostasis de la glucosa es reducir las ceramidas dañinas y mejorar la degradación de las ceramidas a través de los receptores de adiponectina (AdipoR1/AdipoR2). Este proceso de descomposición conduce a la producción de esfingosina-1-fosfato (S1P) y mejora la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa^{169,170}. Como resultado, la mayor sensibilidad a la insulina hepática se retroalimenta a los adipocitos promoviendo la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo. Este efecto resulta en una mayor homeostasis sistémica de los lípidos y la glucosa (Imagen 6)¹⁶².

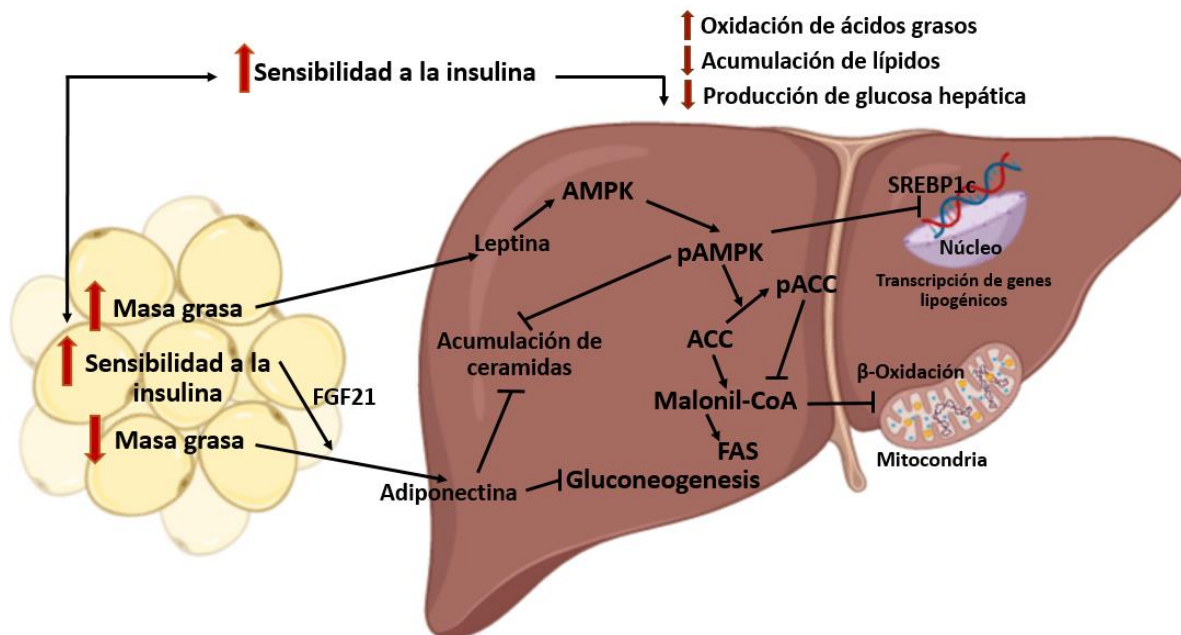


Imagen 6. Esquema de la interacción entre el tejido adiposo blanco y el tejido hepático en el control del metabolismo de la glucosa y de los lípidos en un estado fisiológico (elaboración propia, mediante Biorender).

5.2 LA INTERCOMUNICACIÓN EN UN ESTADO PATOLÓGICO

5.2.1 Metabolismo de lípidos

Como hemos visto anteriormente en este trabajo, el hígado es el órgano de mayor importancia en el metabolismo. Debido a la importancia sistémica de su función, se sabe que un desequilibrio entre la emisión de señales y sus respectivas respuestas entre hígado y tejido adiposo resulta en un desequilibrio homeostático que favorecerá el surgimiento de enfermedades metabólicas.

Es fundamental que el tejido adiposo esté funcionando adecuadamente para que el hígado no sufra con una sobrecarga en el metabolismo lipídico. Por eso, la obesidad y el consumo de grasa son cruciales para comprender el origen de este desequilibrio homeostático. La obesidad es caracterizada por desencadenar una inflamación en el tejido adiposo, desencadenada principalmente por la muerte de los adipocitos, aumentando la cantidad de macrófagos proinflamatorios. Estos macrófagos proinflamatorios (M1), contribuyen a la inflamación crónica de bajo grado asociada con la obesidad. Además, en la obesidad, el estrés mecánico originado por un aumento del almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos (hipertrofiados) también puede inducir inflamación al afectar la expresión genética y la función de los adipocitos. Ya los desencadenantes, como los lípidos de la dieta o los lípidos endógenos, pueden provocar una inflamación del tejido adiposo al activar vías de señalización como NF- κ B, promover la síntesis de quimiocinas y atraer macrófagos proinflamatorios^{163,171}.

La resistencia a la insulina local, desencadenada por la muerte de los adipocitos y consecuente inflamación, conduce a una mayor lipólisis en el tejido adiposo blanco y a una liberación excesiva de ácidos grasos libres para circulación^{172,173}. Con el exceso de ácidos grasos circulantes, la liberación de adipocinas como, adiponectina, leptina, resistina y citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , el tejido adiposo blanco actúa como primer desencadenador de la patogénesis de MASLD. Se ha identificado que en MASLD, los TAGs

hepáticos tienen origen de la lipólisis del tejido adiposo (contribución de 60%), de la lipogénesis *de novo* (contribución de 25%) y la ingesta dietética (contribución de 15%) del total de TAG hepáticos¹⁷⁴.

Tras la liberación de los ácidos grasos (AG) de la lipólisis de TAB, estos lípidos son transportados para el citoplasma hepático a través de FATP2, FATP5 y CD36, aumentando el influjo de ácidos grasos libres dentro del hígado. Una vez dentro de la célula, los AGs se mueven a través de la actividad de FABP1. Sin embargo, con la progresión de MASLD, los niveles intracelulares de FABP1 pueden disminuir, limitando la movilidad de los ácidos grasos y contribuir para la manutención de la esteatosis⁴⁷. Es importante aclarar que en las primeras etapas de MASLD pueda ocurrir un incremento de la expresión de FABP1, con el objetivo de mejorar el flujo de lípidos como mecanismo compensatorio para limitar la lipotoxicidad.

Además, FABP1 ayuda a transportar ligandos de PPAR al núcleo de las células hepáticas, donde PPAR α y PPAR γ son reguladores activos del metabolismo de los lípidos. En condiciones fisiológicas, mientras PPAR α ayuda a aumentar la descomposición de los AGs, conocida como oxidación de ácidos grasos (FAO), para generar energía y reducir la acumulación de grasa en el hígado, PPAR γ influye en el almacenamiento de grasas al promover la adipogénesis y regular la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, con la progresión de MASLD, se observa una disminución de la expresión PPAR α y PPAR γ , debido al deterioro de la función hepática, al aumento del estrés oxidativo y al daño hepático.

Ya en el citoplasma de los hepatocitos, los AGs pueden pasar por una actividad sintética de acil-CoA para la formación de acil-CoA grasos, que luego se oxidan dentro de las mitocondrias a través de la vía de β -oxidación o pueden ser convertidos en triacilglicerol intracelular (TAG) inerte para su almacenamiento en gotitas de lípidos (LD) o acoplarse a apolipoproteínas y luego exportados en formato de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para manutención de los niveles internos de grasa.

Cuando hay un aumento de los niveles intrahepáticos de grasa, la célula conduce a un aumento de la oxidación de ácidos grasos (FAO), con el objetivo de reducir la acumulación de lípidos en el hígado y luego conservar su estado íntegro. Sin embargo, a medida que se avanza la enfermedad hepática, el exceso de FAO puede oprimir el sistema de defensa del hígado, provocando estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La progresión de MASLD puede activar vías alternativas como la oxidación peroxisomal y del citocromo para procesar los ácidos grasos, lo que podría exacerbar el estrés oxidativo y la inflamación.

Un porcentaje de los AGs, está destinado para la formación de las gotitas de lípidos (LD). Este proceso está influenciado por varias vías del metabolismo de los lípidos que regulan la acumulación y degradación de lípidos, lo que contribuye a la esteatosis. El proceso de formación de las LDs se inicia dentro de la bicapa del retículo endoplasmático (RE), por medio de la acción de las enzimas locales del ER como, la carnitina palmitoiltransferasa (CPT1) y la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) que desempeñan funciones cruciales en la introducción de acil-CoA en las vías que conducen a la formación de gotitas de lípidos. Estas enzimas ayudan a esterificar los ácidos grasos (AG) a glicerol-3-fosfato, un paso clave en la biogénesis de las gotitas de lípidos. En seguida, las enzimas DGAT1 y DGAT2 son introducidas al proceso, para participar en la canalización de ácidos grasos en triglicéridos (TAG). A partir de este punto, Ces1d un miembro de la familia de las carboxilesterasas (CES), puede contribuir con el recambio de las gotitas de lípidos hepáticas regulando el tráfico de lípidos y también, en el ensamblaje de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Con las LDs formadas, las lipilipinas (PLIN), como PLIN2, PLIN3 y PLIN5, van a desempeñar un papel crucial en la regulación del metabolismo de los lípidos dentro de las gotitas de lípidos. Además, Cidea y

Cidec actúan directamente en la promoción de la esteatosis hepática, facilitando la fusión de LDs pequeñas y grandes en condiciones de ayuno y obesidad.

La proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP) y la apolipoproteína B (ApoB100) son cruciales para la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). MTTP facilita la transferencia de triglicéridos a partículas de VLDL, esenciales para el ensamblaje y secreción de VLDL. Ya la apolipoproteína ApoB100, como componente estructural de las VLDL, se encarga de estabilizar y formar la partícula VLDL en el hígado. En conjunto, MTTP y ApoB100 garantizan el empaquetamiento adecuado de los triglicéridos en VLDL para su exportación desde el hígado a la circulación, contribuyendo al transporte y metabolismo de los lípidos.

Paralelamente a la entrada de lípidos en el citoplasma celular, los hepatocitos producen ácidos grasos a través de la lipogénesis *de novo*. Esta vía se puede activar por, el aumento de la afluencia de ácidos grasos libres, la resistencia a la insulina y por un aumento de la actividad de ChREBP, consecuente de un aumento de consumo de dietas ricas en carbohidratos y la ingesta de azúcar. La activación de la lipogénesis *de novo* resulta de una sobreexpresión de la proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c), el principal regulador de LDN, en estados de resistencia a la insulina. SREBP1c orquesta la regulación transcripcional de LDN, promoviendo la expresión de enzimas lipogénicas y contribuyendo a la acumulación de especies lipídicas dañinas en el hígado. Es importante destacar que la resistencia a la insulina conduce a una regulación positiva del LDN al aumentar la expresión de SREBP-1c. SREBP-1c puede ser activada por la insulina y el receptor hepático X alfa. Se ha visto que pacientes con MASLD, la expresión de SREBP-1c aumenta, lo que lleva a un aumento de los niveles de triglicéridos hepáticos⁴⁷. Además, se ha descrito que la inhibición de la actividad de SREBP-1c puede reducir la síntesis de ácidos grasos y la acumulación y secreción de TG en el hígado.

Otra proteína que media la lipogénesis *de novo*, es ChREBP1 (específicamente la isoforma ChREBP- β), necesaria para una respuesta lipogénica normal después de la ingestión de carbohidratos, lo que enfatiza su papel crucial en la síntesis de lípidos desencadenada por la ingesta de glucosa. Sin embargo, en individuos obesos y resistentes a la insulina, esta proteína se activa mediante un flujo elevado de hexosa hepática, tras una nutrición rica en fructosa, y contribuyendo así significativamente a la inducción de LDN¹⁷⁵. Por otro lado, estudios han demostrado una función hepatoprotectora de ChREBP, al limitar los niveles de colesterol libre citotóxicos, puede conferir un efecto protector contra el daño hepático inducido por una mayor síntesis de colesterol durante la lipogénesis.

5.2.2 Metabolismo de la glucosa

Como ya se sabe, el metabolismo de la glucosa en el hígado está estrechamente regulado por la insulina. Además, a través de la vía de señalización Akt/PKB la insulina actúa en el hígado para suprimir la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Ya en el tejido adiposo, la insulina irá actuar en la captación de glucosa. Sin embargo, a medida que las células hepáticas pierden la autorregulación mediada por insulina, la producción de glucosa aumenta en ambas vías. Como mencionado anteriormente, la resistencia a la insulina está íntimamente conectada a la progresión de MASLD. Debido a esta resistencia, la insulina no es capaz de suprimir la producción de glucosa hepática, pero continúa estimulando la lipogénesis, lo que resulta en la progresión de esteatosis hepática y desarrollo de la diabetes tipo 2¹⁷⁶.

Estudios demuestran, que pacientes con MASLD pueden experimentar niveles elevados de glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) de 120 minutos, lo que indica un metabolismo anormal de la glucosa¹⁷⁷. Asimismo, se ha visto que las personas con MASLD, exhiben una tasa de gluconeogénesis un 30% más alta. Además, en los individuos con alto

contenido de triglicéridos intrahepáticos, el flujo gluconeogénico se eleva en un 25%, lo que indica un desequilibrio de la gluconeogénesis. La gluconeogénesis es un proceso de formación de glucosa a partir de fuentes distintas de carbohidratos, como por ejemplo el piruvato. En este proceso, la conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato, es crucial para la gluconeogénesis y eso se da por una catalización promovida por la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. La gluconeogénesis elevada en MASLD es el resultado de un aumento de la anaplerosis mitocondrial y del metabolismo oxidativo en el hígado. Eso se debe por la existencia de un vínculo estrecho entre la gluconeogénesis y el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) en el hígado, lo que destaca los intrincados cambios metabólicos en esta enfermedad¹⁷⁸.

Otra vía incrementada en MASLD es la glucogenólisis. En esta enfermedad, hay una elevación de la glucogenólisis debido a la resistencia a la insulina, lo que resulta en un aumento de la glucólisis y consecuente inhibición del flujo gluconeogénico a glucosa-6-fosfato (G6P) por hiperglucemia concurrente. La resistencia a la insulina en MASLD induce a un aumento de los intermediarios glucolíticos hepáticos, llevando a un aumento de la glucólisis y a una regulación positiva de los procesos de descomposición del glucógeno como la glucogenólisis (Imagen 7)^{66,176}.

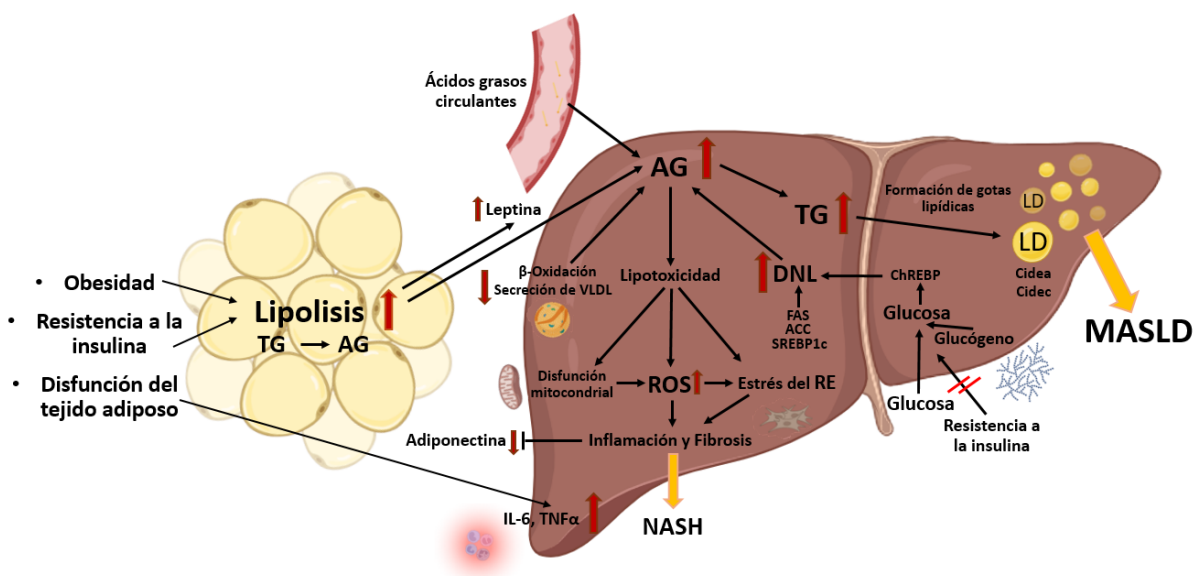


Imagen 7. Esquema de la interacción entre el tejido adiposo blanco y el tejido hepático en el control del metabolismo de la glucosa y de los lípidos en un estado patológico (elaboración propia, mediante Biorender).

6 p107 Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO

6.1 LA FAMILIA DE LAS POCKET PROTEIN Y EL CICLO CELULAR

Está ampliamente descrito que el proceso de división celular está controlado por los reguladores del ciclo celular, representados por ciclinas y quinasas. El proceso del ciclo celular consta de 4 fases, G, S, G2 y M^{179,180}. Sin embargo, para que comience la división celular, la célula debe ser estimulada inicialmente con, por ejemplo, factores de crecimiento. La unión del factor de crecimiento promoverá la activación de ciclinas que fosforilarán la proteína del retinoblastoma (RB)¹⁸⁰.

Las proteínas del retinoblastoma o proteínas *Pocket* (PP) son una familia de supresores de tumores, compuestas por RB/p105, p107 y RB2/p130. El gen del retinoblastoma (Rb) codifica la proteína del retinoblastoma (pRB, RB o RB1). Estas proteínas se caracterizan por tener una región (Dominio *Pocket*) que se une a factores de transcripción (FT), como la familia E2F¹⁸¹. Son de gran relevancia, por controlar la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la S¹⁸¹⁻¹⁸³. Además, la pérdida de la función pRB está relacionada con el desarrollo desordenado de las células, característica de la progresión de las células cancerosas^{182,183}. En consecuencia, la fosforilación de pRB libera los factores de transcripción que activarán la transcripción celular, progresando a la fase S¹⁸⁴. En la fase S y con la acción de las ciclinas se sintetizará el ADN. Tras su síntesis, la célula entrará en la fase G2, donde continúa creciendo y preparándose para la fase de mitosis, fase M^{185,186}.

La familia E2F está compuesta de múltiples proteínas estructuralmente relacionadas, que son importantes reguladores de la proliferación celular. Esta familia consta de ocho miembros: E2F1-6, DP1 y DP2. Se destacan E2F1, E2F2 y E2F3a, que son fuertes activadores transcripcionales unidos e inhibidos por pRB. Los factores de transcripción E2F4 y E2F5 son esenciales para la detención de G1 mediada por proteínas *Pocket* en células en ciclo, lo que indica su función en el control del ciclo celular. Es importante destacar, que los heterodímeros E2F-DP pueden actuar como activadores o represores transcripcionales cuando forman complejos con proteínas *Pocket*.

6.2 FUNCIONES DE P107

6.2.1 p107 y su papel en el ciclo celular

p107 es una proteína nuclear que forma parte de las proteínas de la familia RB, también conocidas como proteínas *Pocket*. Como miembro de esta familia, juntamente con pRB y p130, p107 comparte similitudes estructurales pero tiene funciones y regulaciones distintas^{187,188}. Estructuralmente, p107 y p130 son las dos proteínas que más comparten características comunes. p107 contiene un dominio *pocket* bipartito similar a RB, sin embargo, con una mayor homología de secuencia con p130. Ambas proteínas constan de regiones A y B del dominio *pocket* separadas por una región espaciadora. Tanto p107 como p130 tienen inserciones en la porción C-terminal del dominio *pocket* B que están ausentes en RB, juntamente con un dominio de unión a ciclinas distinto en la región espaciadora entre los dominios *pocket* A y B. Además, p107 y p130 presentan un dominio inhibidor de CDK en el extremo N-terminal que no está presente en RB¹⁸⁹.

La expresión de p107 se regula por la modulación de sus niveles dentro de la célula. Diferente de los niveles constantes de pRB, los niveles de p107 varían de acuerdo con la etapa del ciclo celular. A medida que las células avanzan en el ciclo celular, los niveles de las moléculas de p107 aumentan indicando un mecanismo regulador vinculado a las transiciones del ciclo celular. Esta regulación coordinada de la expresión de p107 durante las transiciones del ciclo celular, permite un control preciso sobre los procesos de crecimiento celular y de la progresión del ciclo celular. Se observan transcripciones elevadas de ARNm de p107 concomitantemente con el aumento en los niveles de proteína p107, lo que sugiere una regulación transcripcional de la expresión de p107. Por otro lado, el control negativo de la expresión de p107 se ejerce a través de los sitios E2F en su promotor, lo que implica la participación de otras proteínas como pRB o p130 en la regulación de los niveles de p107¹⁹⁰.

p107 actúa en el ciclo celular formando complejos estables con los complejos de ciclina A-CDK2 y ciclina E-CDK2, inhibiendo su actividad quinasas¹⁸⁸. Además de la unión a las ciclinas, a través de su región N-terminal, p107 se une a otros factores de transcripción. p107

se puede unir a Sp1 reprimiendo la activación transcripcional, como a Smad3 en respuesta a la señalización de TGF β . Además, esta unión se hace necesaria para la entrada de estos complejos al núcleo celular¹⁸⁹.

Es importante destacar que el papel de p107 en cada fase del ciclo celular es distinta. En la fase G0, p107 interactúa preferentemente con E2F4 y E2F5 con la finalidad de reprimir la transcripción en los promotores regulados por el ciclo celular¹⁸⁸. Durante la fase G1 temprana, p107 continúa reprimiendo la transcripción uniéndose a E2F4 y E2F5, manteniendo su efecto inhibitorio sobre los genes que responden a E2F. Es importante mencionar que p107 se expresa más intensamente durante la transición de la fase G1 a S en células que se dividen activamente, lo que influye en la progresión del ciclo celular^{188,190}. En la fase S, actúa potencialmente como un depósito de un potente represor transcripcional en respuesta al estrés genotóxico y estabilizando p27 para inhibir los complejos Ciclina-CDK. En la fase G2, preparación para la mitosis, el papel de p107 sigue siendo menos claro, solamente con evidencia que sugiere su participación fuera de G1. Son las proteínas RB y p130 que están implicadas en el control de esta fase¹⁹¹. De forma general, p107 desempeña un papel en la regulación del ciclo celular al sustituir potencialmente a pRB en el control de los genes que responden a E2F y contribuir en la detención de G0/G1 a través de su actividad inhibitoria de la quinasa dependiente de ciclina (CKI)¹⁹¹.

6.2.2 p107 y el desarrollo celular

p107 ha demostrado su papel en el ciclo celular. Sin embargo, estudios indican que p107 participa en la regulación del desarrollo de numerosos tipos celulares. Aunque inicialmente se creía que se superponía con la función de RB, estudios recientes han demostrado funciones únicas de p107 en el cerebro, músculos, condrocitos y adipocitos¹⁹². En el contexto del sistema nervioso central, p107 modula de forma única las células precursoras neurales, controlando su capacidad de autorrenovación^{193,194}. Los niveles de la proteína *pocket* p107 son inicialmente altos en células madre indiferenciadas de rápido crecimiento, sin embargo disminuyen durante la diferenciación neural. La expresión disminuida de p107 se asocia con la transición de las células de un estado proliferativo a un estado diferenciado, lo que indica un papel en la regulación de la progresión del ciclo celular¹⁹⁵. De este modo se nota que p107 influye de manera crucial en la expresión de genes implicados en la regulación de la población de precursores neuronales, impactando los procesos de diferenciación. Además, se ha visto que ratones p107 *knockouts* adultos (p107^{-/-}) tienen un número elevado de células progenitoras en proliferación, lo que indica su papel en la proliferación¹⁹³. Se sugiere también, que p107 afecta la proliferación y diferenciación celular, a través del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2). p107 se encarga de regular la capacidad de respuesta de FGF2 en células precursoras neuronales a través de un mecanismo mediado por E2F¹⁹². Por otra parte, una disfunción de p107 puede provocar una diferenciación neuronal alterada y un aumento de la apoptosis en los embriones, lo que enfatiza su importancia en una neurogénesis adecuada¹⁹³⁻¹⁹⁵. Se ha observado también, que la activación de determinadas enzimas, como CDK4/6 puede conducir a la modificación de p107 en las neuronas. Además, la fosforilación y degradación de p107 puede desencadenar la apoptosis en las células neuronales¹⁹⁶.

p107 también ha sido implicada en la diferenciación de los mioblastos. Como en el tejido neuronal, durante la proliferación de los mioblastos, p107 está presente en niveles elevados, pero sus niveles y su expresión disminuyen a medida que avanza la diferenciación, llegando a niveles indetectables^{197,198}. Durante la diferenciación de los progenitores miogénicos, p107 interactúa con el ADN mitocondrial, de esa forma limitando la formación de complejos de cadenas de transporte de electrones y reduciendo la producción de ATP. En otras

palabras, p107 actúa como una molécula de punto de control metabólico que influye en el estado energético de la célula. La sirtuina 1 (Sirt1), un importante sensor de energía celular, mantiene un papel en el control de la localización de p107 dentro del citoplasma, lo que afecta la expresión de genes mitocondriales y en la producción de ATP. Esta interacción es de extrema importancia, por influir en los procesos metabólicos celulares, afectando potencialmente la proliferación y diferenciación celular. Cualquier alteración en la actividad de Sirt1, o en modelos con la inhibición de esta proteína, la interacción con p107 se ve afectada, lo que influye en la localización mitocondrial de p107¹⁹⁹.

Otros estudios ponen de manifiesto también a p107 como un importante regulador de la proliferación de condrocitos. La activación de p107 es esencial para el inicio de la salida del ciclo celular en los condrocitos en maduración, indicando su papel fundamental en la regulación de la proliferación celular del tejido cartilaginoso²⁰⁰. En respuesta a la estimulación del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1), p107 se desfosforila rápidamente independientemente de las actividades de CDK. La activación de p107 por la señalización de FGF conduce a la formación de complejos represivos con E2F4, inhibiendo la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular, ayudando así a la detención y diferenciación del ciclo celular^{200,201}.

Por último, pero no menos importante, la formación de los adipocitos es regulada por las proteínas *pocket*. p107, juntamente con p130 y la proteína del retinoblastoma (RB), influyen en la regulación del ciclo celular en los adipocitos blancos y marrones²⁰². Durante la adipogénesis, p107 participa en la coordinación del equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular. Eso se debe por la interacción entre p107, p130 y RB a otros factores reguladores como HDAC, Sirt1, NCoR y SMRT, que van a influir en el control transcripcional de la formación y función de los adipocitos. Durante la adipogénesis, E2F1-3 y E2F4 tienen efectos antagónicos sobre PPAR γ 1, lo que genera efectos opuestos en la diferenciación de los adipocitos. Estudios en ratones muestran que los animales con deficiencia de E2F1 tienen una capacidad reducida para acumular tejido adiposo, mientras tanto la deficiencia de E2F4 contribuye significativamente para el desarrollo del tejido adiposo. p107 y p130 trabajan en conjunto con las histonas desacetilasas para reprimir genes que inhiben la formación de adipocitos, permitiendo la expresión de PPAR γ y el inicio del programa adipogénico^{202,203}.

En un experimento desarrollado con células madre humanas derivadas del tejido adiposo (hASC) de origen mesenquimatoso, muestran que diferente de p130, que muestra variados patrones de expresión, p107 expone un aumento transitorio constante durante la adipogénesis²⁰⁴. Se ha visto también, que p107 organiza un punto de control metabólico que establece el destino del linaje de adipocitos para los progenitores no comprometidos. En otras palabras, determinar el destino de las células madre en adipocitos blancos o marrones. Estudios con ratones p107 KO indican que la actividad de p107 es crucial para determinar el destino del linaje adiposo. Los ratones p107 KO característicamente, presentan un aumento de adipocitos protermogénicos (adipocitos marrones) y resistencia al aumento de peso^{205,206}. Esta diferenciación en adipocitos marrones, se genera por la intervención del gen PRDM16 (dominio Pr 16) en la reducción de los niveles de p107, dirigiendo las células madre hacia los adipocitos de tipo marrón. Además, en la ausencia de p107 los preadipocitos que normalmente se convertirían en adipocitos blancos se convierten en adipocitos marrones, como se ve por la expresión aumentada de PGC-1 α y UCP-1, una expresión característica del tejido adiposo marrón²⁰⁷. Ya en los adipocitos blancos, la supresión de p107 permite que se produzca un programa de diferenciación protermogénica, protegiendo contra la obesidad²⁰⁵.

6.2.3 p107 y el metabolismo celular

Recientemente se ha discutido sobre el papel de las proteínas *pocket* en el metabolismo celular como un factor clave en el desarrollo de trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes tipo II. Este grupo de proteínas participa en la coordinación del crecimiento y del metabolismo celular, conectando el ciclo celular con las respuestas metabólicas adaptativas^{208,209}. Además, se ha visto que las mismas contribuyen en procesos como, la producción de glucosa, la secreción de insulina, el metabolismo glucolítico y la síntesis de lípidos. Por eso, se entiende que el desequilibrio de las proteínas *pocket* puede provocar el desarrollo de las enfermedades metabólicas²¹⁰. El mecanismo por lo cual las proteínas *pocket* actúan en el metabolismo no están completamente aclarado, sin embargo se sabe que son capaces de interactuar con diversas proteínas y factores de transcripción, resultando en la regulación de los procesos relacionados con el metabolismo. Vale destacar las quinasas dependientes de ciclina (CDK) y los factores de transcripción E2F, que cuando tienen sus actividades moduladas por estas proteínas, influyen en la expresión de genes implicados en las vías metabólicas^{208,211,212}.

Como fue presentado anteriormente en este trabajo, el hígado y el tejido adiposo blanco desempeñan en conjunto un papel importante en la homeostasis energética a través del control del metabolismo de la glucosa y de los lípidos¹⁶². Sin embargo, actualmente hay más datos sobre la función de p107 en el tejido adiposo y algunas de sus acciones en el metabolismo energético, sin embargo, las funciones en el tejido adiposo aún no están dilucidadas. Estudios con ratones p107 KO, demuestran claramente como la ausencia de p107 afecta el tejido adiposo y como sus consecuencias se reflejan en el metabolismo energético. En la ausencia de p107, hay una reducción del tejido adiposo blanco TAB y un amarronamiento de esta grasa para grasa de tipo marrón. Esta conversión del tejido adiposo blanco lleva a un aumento de la tasa metabólica, ya que los adipocitos marrones son responsables por la termogénesis. Además, la disminución del TAB en los animales con ausencia de p107 se asocia con cambios en la masa corporal y en la distribución del tejido adiposo, lo que afecta todavía más el metabolismo energético²⁰⁷.

Con respeto al aumento de la termogénesis resultante de la inhibición de p107, se observa una expresión aumentada de genes termogénicos como UCP1, PGC-1 α y PRDM16 y un aumento de la capacidad oxidativa durante la diferenciación de los adipocitos, afectando el consumo de energía^{205,213}. Además de los cambios provocados en el metabolismo lipídico, la inhibición de p107 altera significativamente la homeostasis de la glucosa. Trabajos con *stem cells* demostraron que la ausencia de p107 conduce a un redireccionamiento del metabolismo de la glucosa hacia la producción de lactato, reduciendo la partición de NADH en las mitocondrias. Este cambio es causado por una mayor expresión de los genes de lactato deshidrogenasa a (*Ldha*) y piruvato deshidrogenasa quinasa 2 (*PDK2*), lo que afecta el equilibrio de la glucólisis y la oxidación mitocondrial. Además, hay una disminución en el transporte malato-aspartato, afectando la transferencia de NADH a las mitocondrias para su oxidación, favoreciendo así la glucólisis sobre el metabolismo oxidativo²⁰⁶.

En un estudio reciente con ratones p107 KO sometidos a una dieta alta en grasa 60%²¹³, se demuestra los beneficios de la inhibición de p107 en la resistencia al desarrollo de la obesidad y de la esteatosis hepática. Los ratones p107 KO exhiben un fenotipo más delgado en comparación con los ratones WT, especialmente cuando son alimentados con una dieta alta en grasa. Otros efectos positivos observados en estos animales son, un mayor gasto energético, mejora de la sensibilidad a la insulina, lo que consecuentemente contribuye a un mejor metabolismo de la glucosa. Interesantemente, se vio que estos animales cuando son sometidos a una temperatura de 4°C, son capaces mantener la temperatura corporal de manera más eficiente que los ratones de tipo salvaje, lo que indica una capacidad termogénica mejorada.

Otro dato destacable, es la disminución del acúmulo de lípidos en el hígado, demostrando una resistencia al desarrollo del hígado graso, comúnmente asociado al consumo de dietas alta en grasas²¹³. Sin embargo, no está totalmente claro el mecanismo de acción de p107 en el hígado y como podría influir en el desarrollo del síndrome metabólico (Imagen 8).

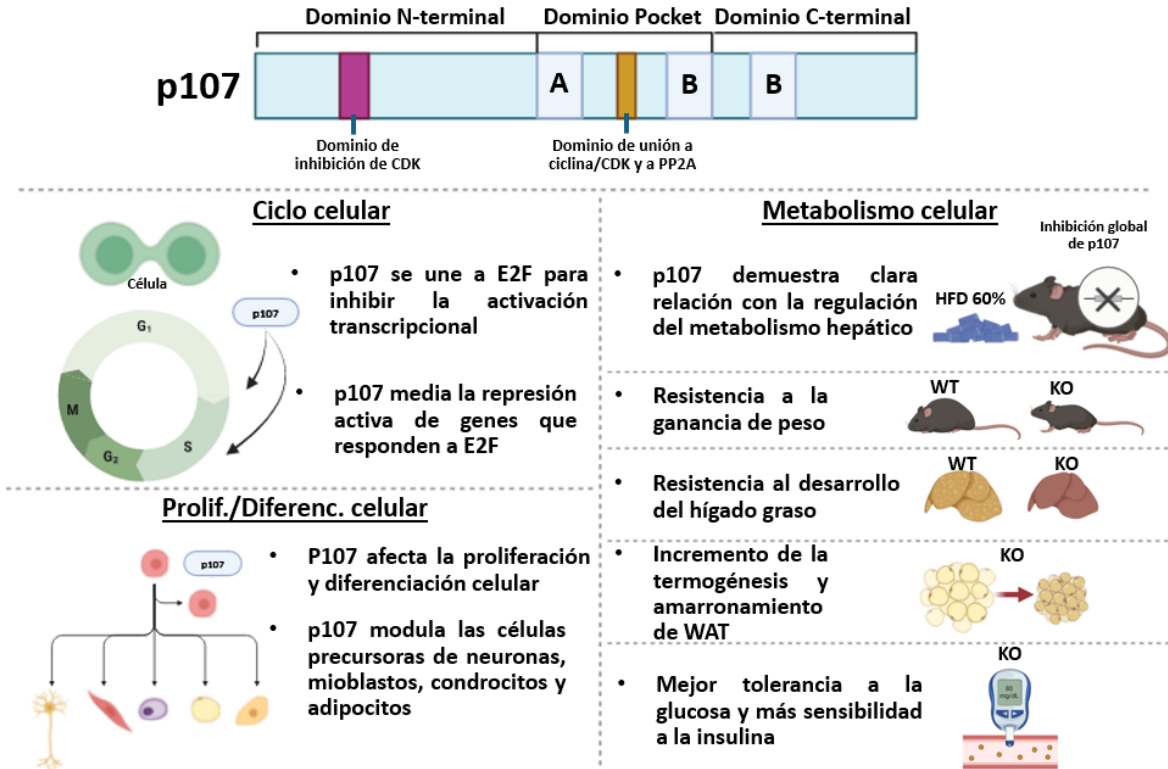


Imagen 8. Diagrama que resume la estructura y dominios de p107, además del conocimiento actual de las funciones en el organismo (elaboración propia, mediante Biorender).

Hasta el presente momento, lo que se sabe más sobre los efectos directos de p107 en el hígado es su papel directo en la proliferación celular. p107 presenta un papel crucial en los hepatocitos al compensar la pérdida de pRB, promoviendo la detención de la proliferación en estas células hepáticas. También, p107 puede funcionar juntamente con p130 para reprimir los genes diana E2F1, inhibir la proliferación y prevenir la hiperplasia hepática. Un papel importante, ya que hepatocitos desprovistos de p107 pueden desarrollar tumores hepáticos con una expresión genética similar al carcinoma hepatocelular humano (HCC)^{214,215}.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Se ha demostrado que p107 está implicado en la regulación del metabolismo energético global y que su inhibición previene el desarrollo de la obesidad y del MASLD. Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que p107 podría ejercer este efecto positivo tanto por acciones directas de su ausencia en el hígado como por la intercomunicación entre el hígado y el tejido adiposo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Para el desarrollo de la presente tesis, el objetivo general propuesto fue:

- ❖ Investigar el papel de p107 en la homeostasis energética y la intercomunicación del hígado con el tejido adiposo en ratones con esteatosis inducida por dieta.

Los objetivos concretos de esta tesis doctoral están divididos en:

- I. Estudiar las acciones de p107 sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa en el hígado y en el tejido adiposo en un modelo de ratón p107 KO global alimentado con dieta CD-HFD.
- II. Estudiar las acciones de p107 sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa en el hígado y en el tejido adiposo en un modelo de ratón deficiente en p107 específicamente en hígado y con esteatosis inducida por dieta alta en grasa (HFD).
- III. Estudiar las acciones de p107 en un modelo de ratón deficiente en p107 específicamente en hígado y con esteatosis inducida por dieta alta en grasa y deficiente en colina (CD-HFD).

MATERIAL Y MÉTODOS

1 EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

Para la realización de los experimentos, se utilizaron modelos animales bajo la supervisión del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela (procedimiento de la Dra. Sulay Tovar Carro; 15010/17/002) que revisó y aprobó el trabajo siguiendo el marco legislativo vigente:

- Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Real decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Ley estatal 32/2007, de 7 de noviembre de 2007, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Decreto 296/2008, de 30 de diciembre de 2008, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.

El nº del certificado de capacitación (según el orden ECC/566/2015 de 20 de marzo) del autor de la tesis es B482 en la categoría “B” y C515 en la categoría “C”, expedido por la Consellería do Medio rural, Axencia Galega da Calidade Alimentaria (AGACAL) – Xunta de Galicia. El centro usuario autorizado que se llevó a cabo la experimentación con animales fue el CEBEGA (Centro de Biomedicina Experimental, número de registro REGA ES150780292901), de la Universidad de Santiago de Compostela.

Considerando las implicaciones éticas aplicadas al uso de animales en la experimentación, los diseños experimentales de esta tesis fueron realizados teniendo en cuenta el principio de las tres R (reemplazo, reducción y refinamiento). Basado en estos principios, a lo largo de la realización de esta tesis doctoral, el autor se aseguró de que los procedimientos realizados fuesen aquellos que: implicasen el uso mínimo de animales sin llegar a comprometer la finalidad del estudio, evitase la duplicación innecesaria de experimentos, afectase lo mínimo a la capacidad de sentir dolor, por tanto, tuvieran mayores probabilidades de producir resultados satisfactorios. Teniendo en cuenta la posibilidad de resistencias a tratamientos y la variabilidad intraespecífica, se ha valorado, en algunos casos, el uso de métodos alternativos, como por ejemplo el cultivo celular. Además, durante el período de experimentación, se puso un especial cuidado en el bienestar de los animales involucrados en este trabajo para reducir el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero.

1.1 ANIMALES, ESTABULACIÓN Y DIETAS

Para el desarrollo de nuestros experimentos, se han utilizado ratones comunes y ratones genéticamente modificados. Los siguientes modelos animales adoptados fueron:

Ratón (*Mus musculus*)

- I. Ratón macho adulto de entre 5 y 6 semanas de edad y un peso aproximado de 25g de la cepa C57BL/6 procedentes del CEBEGA-USC.
- II. Ratón macho KO para el gen *Rbl1* (proporcionados por el Doctor Anxo Vidal, del CIMUS-Universidade de Santiago de Compostela) y sus controles de tipo salvaje (wild type, WT) hermanos de camada. Al inicio de los experimentos los animales tenían 4

semanas de edad. Para la realización de los experimentos se eligieron ratones macho homocigotos para la mutación del gen p107 (p107 KO) y ratones macho homocigotos sin mutación (p107 WT) procedentes de cruces heterocigotos.

Todos los animales descritos anteriormente fueron mantenidos en condiciones SPF (*specific-pathogen-free*). Tras su destete a las 4 semanas de edad o en el momento de su llegada cuando provenientes de otros animalarios, estos animales eran estabulados en racks ventilados en salas con temperatura constante (22°C), humedad controlada y en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. La estabulación de los ratones fue colectiva (4-5 animales por cubetas) para preservar el comportamiento social de los animales. Durante este periodo, los ratones tuvieron acceso libre al agua, comida y materiales de nidificación (enriquecimiento ambiental). Sin embargo, excepcionalmente antes o durante procedimientos experimentales específicos, era requerida una restricción a estos elementos, evitando interferencias en los resultados. Periódicamente, se valoraba el correcto aspecto físico y el manejo por parte del personal de laboratorio era hecho con el objetivo de acostumbrarlos para reducir el estrés generado durante los experimentos. Para animales provenientes de diferentes animalarios o para el cambio de salas dentro de la instalación, se adoptó un periodo de aclimatación mínimo de 7 días previos a cualquier procedimiento. Además, la asignación de los animales en los grupos experimentales se realizaba de forma aleatoria, minimizando el sesgo en la recopilación e interpretación de los datos.

Para la inducción de la obesidad y/o esteatosis hepática en los ratones, se utilizaron diferentes dietas. Una de las dietas era caracterizada por la alta cantidad de grasa, 60% de su contenido - vHFD (*very high fat diet*, D12492, Research Diets); la segunda dieta utilizada no presentaba colina en su composición y tenía 45% de grasa en su constitución - CD-HFD (D05010402, Research Diets). A los grupos controles de los ratones tratados con las respectivas dietas y para el mantenimiento general de la colonia de animales y sus crías, los ratones se alimentaron con un pienso sólido comercial que constituía la dieta estándar (STD, Standard Diet) (Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Envigo). La composición calórica de los macronutrientes para cada dieta aparece representada en la Tabla 1.

Composición	STD (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet)	vHFD (D12492)	CD-HFD (D05010402)
Proteínas (%kcal)	19	20	20
Glúcidos (%kcal)	44	20	35
Lípidos (%kcal)	6	60	45
Total (kcal/g)	3,1	5,21	4,74
Metionina (%Masa)	S	S	S
Colina (%Masa)	S	S	D (0)

Tabla 1. Composición de las dietas STD, vHFD y CD-HFD en %kcal.

1.2 MONITORIZACIÓN DEL PESO CORPORAL, INGESTA Y COMPOSICIÓN CORPORAL

Tras el destete o llegada de los animales a la sala de estabulación, se llevaba a cabo una monitorización del peso corporal tanto de animales con acceso a la dieta control o con acceso a la dieta alta en grasa. La medición del peso podría ser ejecutada por períodos de duración distintos, a largo plazo y a corto plazo. El patrón utilizado para la medición a largo plazo (meses) era de una vez por semana desde el destete del animal hasta su eutanasia. La medición del peso de corto plazo (diario) era aplicada en momentos o experimentos específicos, sin prolongar por

más de una semana. La medición del peso era hecha siempre a la misma hora del día, preferiblemente, al inicio de la fase lumínica 8-10 am, mediante una balanza de precisión (DUNE DCT 201).

El consumo de alimentos fue monitorizado diariamente en ensayos de corta duración. Normalmente, la medición de la ingesta de alimentos se hacía en animales estabulados individualmente, para lograr una mayor precisión del consumo de cada animal. En limitados casos, la ingesta de alimento se promedió en función del número de individuos por caja. Como en la medición del peso, los piensos eran pesados en una balanza de precisión.

Para el análisis de la composición corporal de los ratones, se utilizó una técnica de resonancia magnética de imagen (*Whole Body Composition Analyzer EchoMRI 500, EchoMRI*). La resonancia era efectuada en dos momentos durante los ensayos, al inicio de la introducción de la dieta y con anterioridad a la eutanasia de los animales. De esta manera, podemos analizar los cambios que provoca el tratamiento con las dietas en el almacenamiento de los depósitos grasos. Los parámetros analizados por la resonancia eran: masa grasa (g), masa magra (g), fluidos libres (g) y masa corporal total (g).

1.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

El análisis de la composición corporal se realizó utilizando un sistema de resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) (*Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI; Houston, TX, EEUU*). Este sistema mide la masa grasa, la masa magra y el volumen de fluidos con tiempos de escaneo cortos para asegurar el bienestar animal. Para realizar cada medición, los animales se introdujeron en un adaptador adecuado al tamaño del ratón, sin necesidad de anestesia previa. Se tomaron dos mediciones por animal, empleándose el promedio de ambas mediciones para el cálculo del porcentaje de masa grasa, masa magra y volumen de fluidos por peso total del animal.

1.4 INYECCIÓN EN LA VENA DE LA COLA

La inyección en la vena lateral de la cola (*tail vein injection, TVI*) es el método más comúnmente usado para la administración de vectores virales en el hígado de ratones. Se utiliza un cepo para inmovilizar de forma correcta al ratón (BIOSEB, modelo: TV-150-STD). Para una fácil y correcta administración de las sustancias, se dilata la vena del ratón con una exposición corta (3 minutos aproximadamente) a una lámpara de infrarrojo. Para el procedimiento, se emplea agujas de 27G x 3/8" (0.40mm x 10mm) (*BD Plastipak syringe*) un volumen de 100µL. Los vectores virales se inyectan en las venas laterales que se localizan en ambos lados de la línea central de la cola de los animales. Como las venas son bastante finas y muy superficiales, se debe hacer la inyección de forma paralela a la superficie. En caso de una resistencia al presionar el émbolo de la aguja al inyectar el líquido, se debe remover la aguja y realizar la administración en la vena opuesta. Eso evita un estrés del animal y la pérdida de la sustancia inyectada. Tras inocular la sustancia, se retira la aguja despacio y se presiona la zona para evitar una hemorragia. Mediante este método se han inyectado los siguientes virus:

Virus	Casa Comercial y número de referencia	Dosis (TU/mL)	Vehículo
ARNsh control (directed against Luciferase RNA)	Diana Guallar (vector #pF1200)	10 ⁹	Suero salino

pLKO.pig-GFP:Puro>ARNsh#1 de Rbl1	Diana Guallar (vector #pF1198)	10 ⁹	Suero salino
pLKO.pig-GFP:Puro>ARNsh#2 de Rbl1	Diana Guallar (vector #pF1199)	10 ⁹	Suero salino

Tabla 2. Lista de virus inyectados por la vena de la cola del ratón.

1.5 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL (IP) Y SUSTANCIAS INYECTADAS

Esta administración se realiza en la parte ventro-caudal del animal por debajo del peritoneo. Se inclina levemente la jeringa (1 ml *BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgical Systems*) para evitar que la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgical Systems*) dañe los órganos internos del animal. Se inmoviliza el animal, cogiendo la piel de la espalda intentando oprimirle las extremidades anteriores. Al mismo tiempo se debe sujetar la cola del ratón para evitar una rotación del animal. Se inclina el animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de pinchar las vísceras con la aguja. Esta vía fue utilizada para la administración de glucosa, insulina y piruvato.

1.6 TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT), A LA INSULINA (ITT) Y AL PIRUVATO (PTT)

Los test de tolerancia a glucosa (*glucose tolerance test, GTT*), insulina (*insulin tolerance test, ITT*) y al piruvato (*pyruvate tolerance test, PTT*) se utilizan para averiguar la capacidad del metabolismo de los ratones para tolerar la glucosa, el grado de resistencia a insulina y la capacidad de conversión del piruvato a glucosa.

GTT: Para ejecutar la GTT, 12 horas con anterioridad al test se retira la comida de los animales. Antes de empezar el test, pesamos los animales y tomamos la medida de los valores de glucosa basales, a través de una gota de sangre de la cola y medida con una tira reactiva conectada a un glucómetro. En seguida, inyectamos glucosa vía IP en función de su peso (2 g/kg de D-glucosa). La glucosa sanguínea se toma a través de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección.

ITT: Para la ITT, los animales se encuentran en condiciones *ad libitum* antes de comenzar el experimento, momento que se les retira la comida. Como en la GTT, antes de empezar el test, pesamos los animales y tomamos la medida de los valores de glucosa basales. En seguida, inyectamos insulina (0,75 U/kg) vía IP en función de su peso. La glucosa sanguínea se toma a través de la cola a los 15, 30, 60 minutos después de la inyección.

PTT: Para la PTT, los animales son sometidos a un ayuno de 12 horas previamente al test. Como las demás pruebas, se pesan los animales y se toma la medida de los valores de glucosa basales. A continuación, inyectamos piruvato (10 µL/g) vía IP en función del peso del animal. La glucosa sanguínea se toma a través de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección.

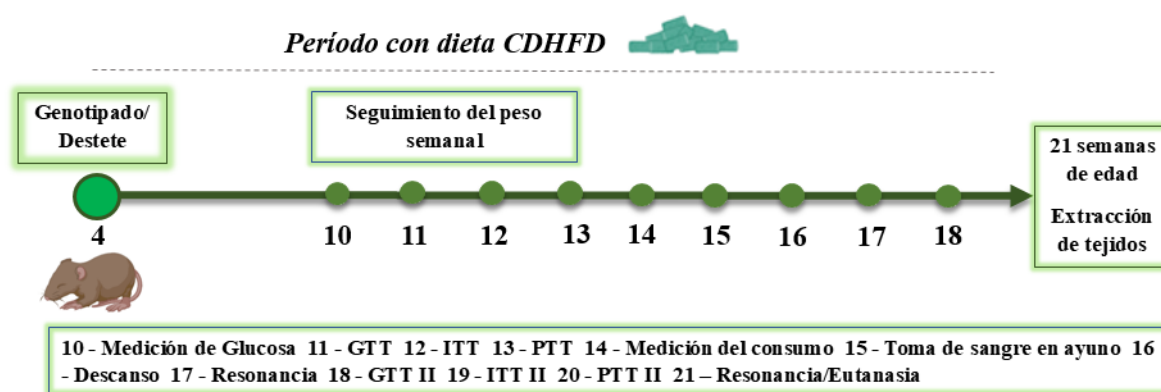
1.7 EUTANASIA, RECOGIDA DE TEJIDOS Y MUESTRAS

Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. La muerte del animal era confirmada por una dislocación cervical. Por su carácter de procedimiento terminal, la punción intracardiaca era utilizada para recoger la sangre del animal. La sangre fue recolectada en tubos específicos (Sarstedt) para obtención de suero y plasma. Se

centrifugaba la sangre a baja temperatura y luego se recolectaba el sobrenadante en ambos casos. Las muestras eran almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, se recogía muestras de tejido hepático y adiposo (blanco, subcutáneo y marrón). Se registró la masa de estos tejidos con una balanza de precisión. Los tejidos eran cortados y pequeñas partes de cada tejido era introducida a una cestilla que seguidamente sería guardada en paraformaldehído 10% para una futura tinción histológica. El tejido sobrante era almacenado en $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para experimentos de análisis molecular.

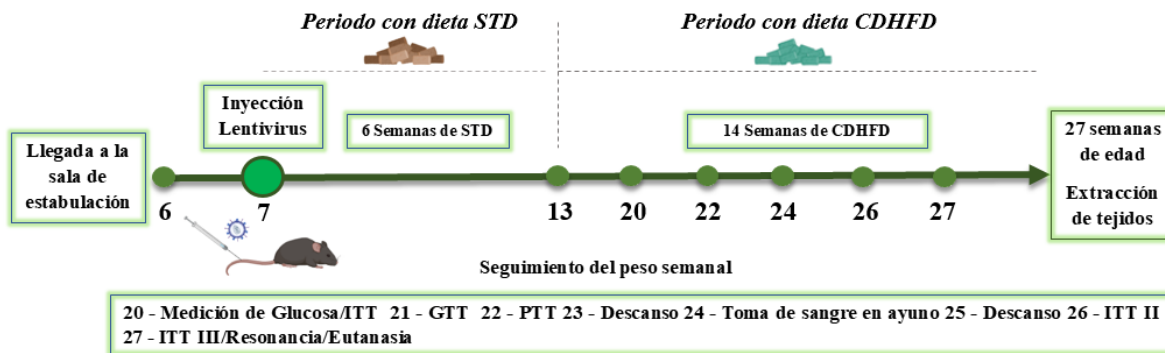
2 DISEÑOS EXPERIMENTALES EN RATONES

2.1 ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS RATONES P107 *KNOCKOUTS*



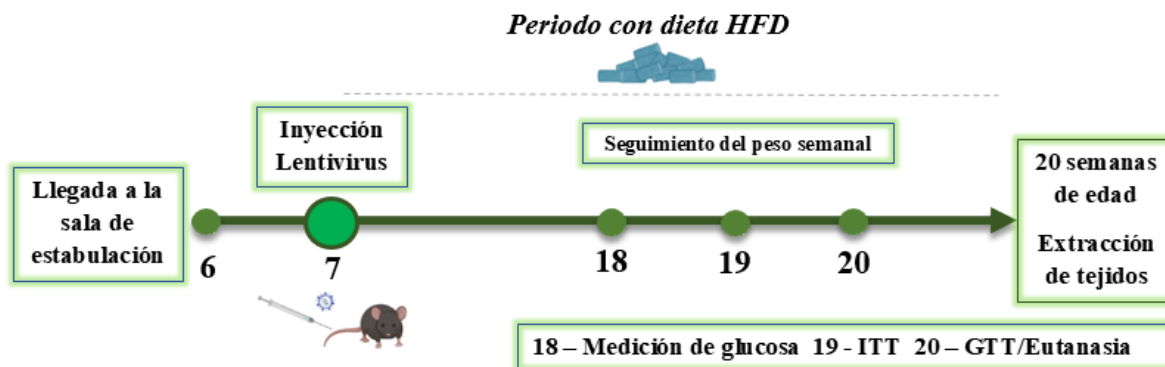
Para este experimento, se utilizaron ratones macho p107KO. Los animales KO, juntamente con sus controles WT (hermanos de camada) empezaban el experimento con aproximadamente 4 semanas de edad. Los animales fueron sometidos a las dietas tras el destete, hasta su sacrificio a las 21 semanas de edad. Desde el destete de estos animales se hizo un seguimiento de 17 semanas del peso corporal. Con diez semanas de edad se empezaron experimentos semanalmente hasta las 21 semanas de edad. Todos los procedimientos ejecutados semanalmente están mencionados en el diseño experimental arriba. Al final del experimento, los animales fueron eutanasiados y los tejidos de interés recogidos para un futuro análisis molecular.

2.2 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE HÍGADO DE P107 DURANTE 20 SEMANAS EN RATONES C57BL6 EXPUESTOS A DIETA CDHFD



En este experimento, se utilizaron ratones machos adultos de 6 semanas de edad y un peso aproximado de 25g de la cepa C57BL6. Estos animales procedentes del CEBEGA, entraron en la sala de estabulación con 6 semanas de edad y tras una semana de adaptación, se realizó la inyección de los lentivirus (shLuciferasa - grupo control y shp107 - grupo experimental). Se inyecta el lentivirus a través de la vena de la cola para disminuir la expresión de p107, mayoritariamente en el hígado. En seguida, los ratones fueron devueltos a la misma caja con acceso a una dieta estándar (STD). Durante 6 semanas los animales consumieron una dieta estándar. A las 13 semanas de edad estos animales pasaron a tener acceso a una dieta alta en grasa sin colina (CDHFD). El seguimiento semanal del peso corporal, se hizo desde la sexta semana de edad hasta la eutanasia de los ratones (27 semanas de edad). A partir de las 20 semanas de edad, se empezaron los experimentos semanales con los animales. Al final del experimento, los animales fueron eutanasiados y los tejidos de interés recogidos para un futuro análisis molecular.

2.3 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE HÍGADO DE P107 DURANTE 11 SEMANAS EN RATONES C57BL6 EXPUESTOS A DIETA HFD



Para el siguiente experimento, se utilizaron ratones machos adultos de 6 semanas de edad y un peso aproximado de 25g de la cepa C57BL6. Estos animales provenientes del CEBEGA, entraron en la sala de estabulación con 6 semanas de edad y tras una semana de adaptación, se realizó la inyección de los lentivirus (shLuciferasa - grupo control y shp107 - grupo experimental). Se inyecta el lentivirus a través de la vena de la cola para disminuir la expresión de p107, mayoritariamente en el hígado. En seguida, los ratones fueron devueltos a la misma caja con acceso a una dieta alta en grasa 60% (HFD). Durante 13 semanas los animales consumieron una dieta HFD. El seguimiento semanal del peso corporal, se hizo desde la sexta semana de edad hasta la eutanasia de los ratones (20 semanas de edad). A partir de las 18

semanas de edad, se empezaron los experimentos semanales con los animales. Al final del experimento, los animales fueron eutanasiados y los tejidos de interés recogidos para un futuro análisis molecular.

3 GENOTIPADO DE RATONES

3.1 GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

3.1.1 Extracción de ADN a partir de un fragmento de cola

Para el genotipado de los ratones se cortó una pequeña muestra de la punta de la cola (<5mm) antes del destete a las cuatro semanas de edad. Posteriormente, con las colas colectadas, se procedía la extracción del ADN. Inicialmente, añadimos 500µL de tampón de cola (Tabla 3) y 10µL de proteinasa K (20mg/mL) (Invitrogen). Las muestras eran puestas en un termobloque a 55°C con agitación, donde quedaban toda la noche para la digestión completa de la cola y la exposición del material genético.

Composición del tampón de cola	
Tris	100mM pH 8
EDTA	0,5mM pH 8
SDS	0,2%
NaCl	200mM
Completar con agua destilada un volumen de 500mL	

Tabla 3. Composición del tampón de cola para extracción de ADN.

Una vez digerida la cola, los pasos siguientes son:

- I. Centrifugar las muestras a 13000 rpm por 15 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- II. Añadir 500µL de isopropanol 100% y mezclar mediante resuspensión.
- III. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos. Al final, se descarta el sobrenadante con cuidado para no perder el precipitado.
- IV. Añadir 500µL de etanol 70% e invertir algunas veces para lavar el material precipitado.
- V. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
- VI. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante 30 minutos con los tubos abiertos.
- VII. Al final, añadir 50µL de agua Milli-Q y guardar a 4°C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR).

3.1.2 Amplificación mediante PCR convencional

Al terminar la extracción del ADN genómico, procederemos a su amplificación mediante PCR convencional utilizando los iniciadores (primer) específicos. Los iniciadores fueron sintetizados por EUROFINSDNA (ThermoFisher) con una purificación tipo HPSF y una concentración de 0,01µmol.

p107WT	TGTGCTGAGCATGAACAGAC	60
p107KO	ACGAGACTAGTGAGACGTGC	62
p107 Común	TCGCTGGCAGTCTGAGTCAG	64

Tabla 4. Oligonucleótidos para el genotipado de los ratones p107 KO.

En la siguiente tabla se detalla las etapas y ciclos del proceso de amplificación de la secuencia específica:

Paso	T (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	1	34
Alineamiento	55	1	34
Extensión	72	1	34
Elongación final	72	4	1

Tabla 5. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones p107 KO.

Para proceder con la PCR, se preparó una mix de reactivos para la amplificación de la secuencia específica:

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (µL)
H2O Milli-Q	-	-	19,85
Tampón Taq polimerasa 10x	Thermo Fisher Scientific (EP0712)	-	2,5
dNTPs	Thermo Fisher Scientific 100Mm dNTP set (10297018)	4mM	0,2
Oligo p107 WT	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5µM	0,2
Oligo p107 KO	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5µM	0,2
Oligo p107 Común	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5µM	0,2
DMSO	Sigma-Aldrich (D9170)	-	0,5
Taq polimerasa	Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific (EP0712)	-	0,2
Añadir 24 µL de mezcla de PCR y 2 µL de ADN genómico			

Tabla 6. Cantidades de los reactivos necesarios para la mezcla de PCR de los ratones p107 KO.

La PCR se ha realizado en el termociclador T100TM Thermal Cycler de BIO-RAD.

3.1.3 Electroforesis de agarosa

Por medio de la electroforesis en gel de agarosa, se hizo la separación de los fragmentos de ADN correspondientes con cada uno de los alelos. Se preparó el gel de agarosa a una concentración del 2% en tampón de electroforesis TAE (TRIS 40mM pH 7,6; ácido acético

20mM y EDTA 1mM). Al cargar el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen) y las muestras, se aplicó un voltaje de 100V durante 30 minutos, sumergido en el tampón de electroforesis. Al final, el ADN de las muestras se visualizó mediante la incorporación de Red Safe (iNtRON biotechnology) al gel, usando un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 1000 de BIO-RAD.

4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE TEJIDOS

Para esta tesis doctoral se han realizado diferentes tinciones histológicas que nos han permitido visualizar la morfología celular y la acumulación de lípidos. Para el análisis histológico, la cantidad de tejido utilizado y el almacenaje inicial de las muestras, dependen del tipo de tinción elegido para el análisis propuesto. Para muestras destinadas a la técnica de hematoxilina/eosina se extrae el tejido y luego se las coloca en un cassette de histología que se embebe en paraformaldehído al 10 %. Tras un día en paraformaldehído, se traspa las muestras para un recipiente con etanol 70%. Para llevar a cabo la técnica de tinción Oil red O, una vez retirado el tejido hepático del ratón, una fracción de la muestra del hígado se congela a -20°C. En ambos casos se realizaron cortes histológicos por el personal técnico (Ana Senra) del CIMUS, encargado de preparar las histologías. Una vez obtenidas las tinciones, se examinaron y fotografiaron los cortes con un microscopio (Zeiss) utilizando los objetivos de 10, 20 y 40 aumentos.

4.1.1 Hematoxilina y eosina

El objetivo de esta técnica es teñir los componentes celulares destacando, de forma general, la estructura del tejido. Esta técnica tiñe diferencialmente de azul/morado y rosa/rojo las partes ácidas y básicas de las células. Como la hematoxilina es de naturaleza básica (catiónica), va a teñir de azul/morado las estructuras ácidas (basófilas) como los núcleos celulares. Por otra parte, la eosina que es una estructura ácida, consecuentemente tiñe de color rosa/rojo estructuras como el citoplasma, que son de naturaleza básica. De esta forma, se permite analizar la estructura general del tejido. Esta técnica tiene bastantes beneficios, por generar un contraste entre las estructuras celulares, preservar la morfología celular y tener una durabilidad en la coloración. Sin embargo, es un método sensible a variaciones en el procedimiento y además, puede no ser tan específico a determinadas estructuras. En el caso del tejido hepático, dependiendo de sus características se puede detectar: infiltración de células inflamatorias y fibrosis, además de esteatosis (microvesicular o macrovesicular).

Finalizado el proceso de fijación con paraformaldehído 10%, las muestras fueron deshidratadas tras 24 horas e incluidas en parafina. A través de un microtomo, se cortaron secciones de 4 µm y luego se las trataron con xilol para eliminar los excesos de parafina. A continuación, se realizó un proceso de rehidratación, que consiste en exponer las secciones a soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100°, 95° y 70°). Se lavaron las secciones con agua destilada y las mismas fueron sumergidas en solución de hematoxilina (*Bio Optica*) durante 10 minutos. En seguida se lavaron las secciones nuevamente y fueron sometidas a un alcohol ácido. El siguiente paso fue sumergir las secciones por 30 segundos en eosina (*Bio Optica*). Como parte final del proceso, las secciones fueron lavadas con agua destilada,

deshidratadas, secadas a una temperatura de 37°C durante 30 minutos y montadas en medio de montaje permanente.

4.1.2 Oil Red O

Esta tinción permite evaluar el acúmulo de lípidos en el hígado, una característica de la esteatosis hepática. Las muestras congeladas de tejido hepático fueron cortadas en secciones de 10 µm de grosor, mediante el uso de un criostato. Posteriormente, las secciones eran fijadas en formalina neutra tamponada al 10%, durante toda la noche. El próximo paso fue teñirlas en Solución *Oil Red* (MERCK) durante 20 minutos. Tras el lavado en agua destilada, las secciones fueron contrateñidas con Hematoxilina de Harris (Bio Óptica) durante 10 minutos. Por último, se lava las secciones y se montan en un medio de montaje acuoso. Una vez hemos tomado las fotos con el microscopio (Zeiss), se cuantifica el acúmulo de lípidos mediante el programa *Image J* (*ImageJ-1.33, Wayne Rasband*).

4.1.3 Sirius Red

La tinción histológica de secciones de tejido con Sirius Red, específica de colágeno, permiten evaluar la fibrosis del tejido hepático. Las muestras fueron fijadas en parafina, cortadas, tratadas con xilol e hidratadas y tratadas con solución PicroSirius durante 1 hora. A continuación, se lavaron las muestras con agua destilada, se deshidrataron con etanol y se montaron en medio resinoso.

4.2 DETECCIÓN DE METABOLITOS EN TEJIDO

4.2.1 Extracción de grasa hepática

Para el procedimiento de extracción de la grasa hepática, previamente se pesaron 0,05g de hígado y se llevaron a un tubo de polipropileno de 2ml con una bola de acero. Una solución de cloroformo/metanol (2:1, vol/vol) fue preparada y 500µL fueron añadidos al tubo de polipropileno con las muestras. En seguida, se homogenizó el tejido por acción mecánica en el *Tissue Lyser II* (Quiagen) a una frecuencia de 22 l/s, durante 4 minutos. Tras homogenización de las muestras, se mantuvieron en rotación orbital (3-5h a 30rpm) a temperatura ambiente, para facilitar la disolución de la grasa en el disolvente orgánico. Finalizada la rotación, se añadieron 300µL de agua destilada y se centrifugaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, para la separación de fases. Con las fases definidas, descartamos la fase inorgánica superior y se pasó a la fase orgánica inferior a un nuevo tubo de polipropileno de 1,5mL. Todos los tubos con las muestras, fueron dejados en una campana de extracción de gases para que el disolvente orgánico se evaporara durante la noche. El precipitado final obtenido de la evaporación, corresponde a la grasa extraída del tejido. Luego se analiza la composición de colesterol y triglicéridos (TGs) con un método enzimático colorimétrico. Sin embargo, si la muestra fuera almacenada a -20°C se debe hacer la disolución de la grasa en 800 µL de cloroformo.

4.2.2 Determinación de colesterol y triglicéridos en muestras de grasa hepática

Para la cuantificación de colesterol y triglicéridos (TG) se utilizó un kit comercial (*Spinreact*). Tras la evaporación de una parte de la fase orgánica, se añade el reactivo (relativo al colesterol o a triglicéridos) al precipitado y se incuba en oscuridad por 5 minutos a 37°C. Durante ese período, una reacción enzimática se produce, generando una coloración roja/rosa. Finalizados los 5 minutos, las muestras son distribuidas en una microplaca de 96 pocillos que será introducida al espectrofotómetro. El contenido de colesterol y de TGs de cada muestra se midió por duplicado. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol y de TG presente en la muestra. Con un espectrofotómetro utilizando una longitud

de onda de 505nm se hace la lectura de las muestras y se calcula la concentración del lípido analizado considerando el peso del tejido.

4.2.3 Determinación de colesterol y triglicéridos en muestras de plasma y suero

Para la cuantificación de colesterol y triglicéridos circulantes, se utilizó el kit comercial (*Spinreact*). Antes de la introducción de las muestras en el espectrofotómetro, se realiza una dilución del suero y del plasma en agua destilada para disminuir la concentración de lípidos en la muestra. La dilución se hace necesaria para evitar que los valores resultantes salgan de la recta patrón. Hecha la dilución, las muestras son distribuidas en la microplaca de 96 pocillos. Se añade el reactivo a la placa y se incuba en oscuridad por 5 minutos a 37°C. La lectura de las muestras y de la recta patrón se realiza con una longitud de onda de 505 nm y se calcula la concentración de los respectivos lípidos de acuerdo con la dilución hecha.

4.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Los niveles de las proteínas analizadas en este estudio fueron determinadas cuantitativamente por la técnica de *Western blot*. Esta técnica analítica, también conocida como electrotransferencia o inmunoblot, se basa en una detección de proteínas específicas de un extracto de tejidos a través de la unión específica del antígeno-anticuerpo.

4.3.1 Extracción de proteínas

A partir de las muestras de tejido conservadas a -80°C, se cortó un fragmento del tejido para ser procesado. Todo el proceso, se realiza en hielo para evitar que las proteínas se degraden. La muestra de tejido (el tamaño de la muestra depende del tipo de tejido, debido a la diferente concentración proteica en cada tejido) se introduce en un tubo de polipropileno de 2mL y se le añade una bola de acero y un volumen determinado de buffer/tampón de lisis (en una proporción 1:5 peso:volumen). El tampón de lisis es una mezcla de inhibidores de proteínas y de fosfatasa (dilución 1/100 - *Sigma-Aldrich*), que rompe las células y expone las proteínas sin que se desestabilicen. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente por un proceso de fragmentación y rotura celular mediante el uso de un homogeneizador *TissueLyser II (Qiagen)* a 25rpm durante 5 minutos. Una vez terminada la homogenización de la muestra, se centrifugaron a 13200 rpm a 4°C durante 30 minutos. Con la ayuda de una micropipeta, se retiró primeramente el sobrenadante (contenido proteico), sin coger la posible capa superior de lípidos. La capa superior y el precipitado (núcleos y restos de tejido) se descartó posteriormente. En el caso de las muestras de tejido adiposo e hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasa, requiere una sucesión de centrifugaciones para descartar la alta cantidad de grasa presente. Los componentes del tampón de lisis disueltos en H₂O destilada son los siguientes:

- ❖ 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Trizma base T6066, MERCK)
- ❖ 1 mM EGTA (E3889, MERCK)
- ❖ 1 mM EDTA (E9884, MERCK)
- ❖ 1% (v/v) Triton X-100 (X100, MERCK)
- ❖ 1 mM ortovanadato sódico (S6508, MERCK)
- ❖ 50 mM fluoruro sódico (S7920, MERCK)
- ❖ 5 mM pirofosfato sódico (221368, MERCK)
- ❖ 0,27 M sacarosa (84097, MERCK)
- ❖ 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonio (P7626, MERCK)
- ❖ 1 pastilla cóctel de inhibidores de proteasas (11836145001, ROCHE) por cada 50 ml de buffer de lisis.

Para la cuantificación de proteínas en los extractos se utilizó el método colorimétrico de *Bradford* (*Protein Assay Kit*, Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método se caracteriza por el cambio de color del colorante *Coomassie brilliant blue*, cuando expuesto a diferentes concentraciones de proteínas. La forma roja de este compuesto se convierte en azul cuando se une con las proteínas presentes en las muestras. Inicialmente, se realiza una dilución para que la concentración de proteína esté dentro del espectro de medición del espectrofotómetro. Para la dilución de los extractos de proteínas, se toman 10uL de muestra y se añade un volumen de agua destilada estimada para cada tipo de muestra (dependiente del tipo de tejido originario). Inicialmente, las diluciones preparadas de los extractos de proteínas fueron mezcladas con la solución *Bradford* (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, BIO-RAD) e incubadas a 37°C durante 5 minutos en una placa multipocillo de 96 pocillos. Consecuentemente, la unión de este colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante a 465 a 595nm. Posteriormente, se midió la absorbancia a 590 nm a través del equipo *ThermoScientific Multiskan GO*. La concentración de proteínas en cada muestra utilizada fue calculada en relación a los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón de BSA (albúmina de suero bovino), de la cual se añade 10 µL de cada punto de la recta en la placa, por duplicado. Al final, se prepararon alícuotas de 16 µL que contenían 20 µg para cada muestra (15 µg en el caso de extractos de tejido adiposo blanco) utilizando tampón de Laemmli.

4.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE

Terminada la cuantificación, preparamos las muestras junto con el tampón de carga (tampón de Laemmli). Debido a la presencia del dodecil-sulfato sódico (SDS) en su constitución, este tampón es capaz de dotar a todas las proteínas de carga negativa en proporción a su tamaño, además permite su desnaturalización gracias al β-mercaptoetanol, el cual elimina los puentes disulfuro. A cada muestra le fue añadida la misma proporción de solución de carga. De esta forma, facilita su carga en el gel y además se añade un colorante necesario para su identificación durante el proceso de migración en el gel (azul de bromofenol, Merck). La cantidad total de proteína de las muestras usadas varió entre 15 y 20µg dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado y el tejido analizado. Todas las muestras deben tener la misma concentración final para que en el volumen de carga de cada muestra en la electroforesis haya la misma cantidad de proteína. Tras añadir el tampón de carga y antes de realizar la electroforesis, las muestras deben calentarse a 95 °C durante 5 minutos para su completa desnaturalización. Finalizado el uso de las muestras, se deben almacenar a -20 °C. La composición del tampón de Laemmli (en H₂O destilada) es la siguiente:

- ❖ 250 mM Tris-HCl pH 6,7
- ❖ 50% (v/v) glicerol (G5516, MERCK)
- ❖ 10% (m/v) SDS (L4509, MERCK)
- ❖ 5% (v/v) β-mercaptoetanol (M3148, MERCK)
- ❖ 0,0005% (m/v) azul de bromofenol (8122, MERCK)

4.3.4 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE, es una técnica que se basa en la separación de las proteínas por su tamaño (masa) y carga eléctrica. Primeramente, se montaron dos cristales en una estructura, para añadir la mezcla de los compuestos para la polimerización del gel. Se preparó un gel en forma de red, que consiste en una estructura tridimensional formada por la polimerización de poliacrilamida (N, N-metilenobisacrilamida). Este proceso de polimerización se cataliza con persulfato amónico

(*Ammonium persulfate*, APS; Sigma-Aldrich) y TEMED (N,N,N,N-tetramethyletilenediamina, Sigma-Aldrich). Los geles pueden presentar concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida (30% *Acrylamide/Bis Solution* 29:1, Bio-Rad) diferentes, lo que determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y consecuentemente el grado de migración de las proteínas según su tamaño. El porcentaje del gel es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. El gel está dividido en dos fases. La fase superior o concentradora, caracterizada por la presencia de un poro de tamaño muy amplio que permite que las proteínas entren en la segunda fase al mismo tiempo y formando una mezcla homogénea. La fase inferior o separadora, permite la separación de las proteínas únicamente en función del tamaño. En la fase superior, el porcentaje de acrilamida es siempre 5% de acrilamida/bis-acrilamida. Por otro lado la fase inferior, el porcentaje de acrilamida varía en función del tamaño de las proteínas a estudiar (entre 8%, 10% y 12%). Al añadir la mezcla para formar la fase superior, se insertan los peines (en este caso de 15 pocillos) que permiten la formación de los pocillos de carga. Una vez solidificado, se puede cargar los pocillos del gel con 16 μ L de la muestra. Las proteínas migran a través del gel desde el polo negativo hacia el polo positivo, cuando es aplicada una corriente eléctrica. Además, las proteínas se separan por su peso molecular en gradiente de mayor a menor.

Gel concentrador:

- ❖ 4,10 ml H₂O destilada
- ❖ 1,00 ml 30% acrilamida/Bis 29:1 (1610156, Bio-Rad)
- ❖ 0,75 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
- ❖ 0,06 ml 10% (m/v) SDS
- ❖ 0,06 ml persulfato amónico (A3678, MERCK)
- ❖ 6 μ l TEMED (tetramethyl-ethylendiamine) (T9281, MERCK)

Gel separador (ejemplo: 8%):

- ❖ 11,50 ml H₂O destilada
- ❖ 6,70 ml 30% acrilamida/Bis 29:1
- ❖ 6,30 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8
- ❖ 0,25 ml 10% (m/v) SDS
- ❖ 0,25 ml persulfato amónico
- ❖ 15 μ l TEMED

En determinados momentos también se usaron geles comerciales (5671105, Bio-Rad) de 25 pocillos. Los geles, se montaron en la cubeta de electroforesis *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (165-8004, Bio-Rad) se sumergieron en un tampón de electroforesis, y se cargaron 16 μ l de cada muestra en los pocillos del gel permitiendo la transmisión del voltaje. Se utilizó el primer pocillo de todos los geles para cargar 10 μ l de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards-Dual Color*, Bio-Rad). En cada gel siempre se cargaron muestras de todos los grupos experimentales. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron: voltaje constante de 90V - 120V y amperaje de 180 mA aplicados con un equipo *PowerPac HC High Current Power Supply* (164-5052, Bio-Rad) durante aproximadamente 2 horas. La composición del tampón de electroforesis (em H₂O destilada) es la siguiente:

- ❖ 200 mM Tris-HCl
- ❖ 20 mM glicina (G7126, MERCK)
- ❖ 1% (m/v) SDS

Al final de la electroforesis, las proteínas deben ser transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, 1620177, Bio-Rad), para posibilitar el análisis de expresión de cada proteína. Para ello, se utiliza el equipo *Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell* (170-3940, Bio-Rad), que mediante un campo eléctrico es capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde se realizarán futuramente las incubaciones con los diferentes anticuerpos. Se realizó una transferencia de tipo semi-seca. En este método, las membranas PVDF (dimensiones de 8,6 x 7,1 cm) son activadas previamente durante 5 minutos en metanol, luego lavadas en H₂O destilada y por fin empapadas por 5 minutos con tampón de transferencia. En continuación, el gel es colocado sobre una membrana PVDF y estarán entre dos superficies de papel de transferencia (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) y las placas que crearán el voltaje. El papel de transferencia debe estar empapado con el tampón de transferencia de composición (en H₂O destilada):

- ❖ 40 mM Tris-HCl
- ❖ 40 mM glicina
- ❖ 0,36% (m/v) SDS
- ❖ 20% (v/v) metanol (414816, Carlo Erba Reagents)

Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron: amperaje constante 0,8 mA por cm² aplicados por una fuente de energía *PowerPac HC High Current Power Supply* durante 1 hora y 40 minutos. Para comprobar si la transferencia fue eficaz, se utilizó la tinción de rojo Ponceau (*Ponceau S Red*, Sigma-Aldrich). Se lavó el exceso con agua destilada y TBS-T para acabar de eliminar la tinción.

4.3.6 Inmunodetección

Para la detección de las proteínas de interés, se emplea un método de detección inmunológico, que se basa en cuatro etapas:

- Bloqueo de la membrana: en este proceso la membrana PVDF se incubaba durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con una solución de BSA (sero-albúmina bovina) al 5% (Sigma) disuelto en tampón de lavado (TBS Tween 0,1%). La composición del tampón de lavado TBS-T es la siguiente (en H₂O destilada):

- ❖ 20 mM Tris-HCl
- ❖ 146 mM NaCl
- ❖ 0,1% (v/v) Tween-20 (P9416, MERCK)

Como los anticuerpos deben unirse solamente a su antígeno específico, utilizamos BSA en disolución para unirse a todos aquellos lugares de la membrana que no deben ser ocupados por los anticuerpos, de esa forma reducimos las uniones inespecíficas. Dependiendo de las especificaciones de determinados anticuerpos para la inmunodetección, se utilizó una solución de bloqueo con leche en polvo desnatada comercial (Dietisol, leche desnatada polvo 350 gramos; Dietisa; Nutrition & Santé), también al 5% disuelta en tampón de lavado.

- Anticuerpo primario: tras una hora de bloqueo, se incubaba la membrana en una solución 3% (m/v) BSA en buffer de lavado TBS-T hecha con el anticuerpo primario específico (a una concentración de 1:1000 o 1:500) contra la proteína a detectar (Tabla 7). Se incubaba la membrana durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente finalizada la incubación, se retira el anticuerpo y se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado (TBS-T).

- Anticuerpo secundario: se incubaron las membranas con una solución 3% (m/v) BSA en buffer de lavado TBS-T con el anticuerpo secundario específico (reactividad a ratón o conejo) para el anticuerpo primario utilizado, a una concentración 1:5000, a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios (Dako) utilizados están asociados a la enzima peroxidasa (Horseradish Peroxidase) que es capaz de reconocer la parte constante del anticuerpo primario. De esta forma, se detecta la presencia de la proteína y amplifica la señal del anticuerpo primario.

- Revelado y fijación de la señal: para detectar el complejo de anticuerpos unido a la proteína de interés, se debe incubar la membrana con una mezcla 1:1 de sustrato de la peroxidasa y un potenciador de quimioluminiscencia (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific), incubándose durante 5 minutos en oscuridad. Inmediatamente después, se colocó la membrana en un casete de autorradiografía (*Hyperscassette*, Amersham Biosciences) con el objetivo de detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa. El revelado debe ser realizado en una sala oscura, donde se utilizaron placas radiográficas Fujifilm (*FujiMedical X-Ray Film Super RX*, Fujifilm Corporation) para la visualización. Las películas fotográficas se colocaron en el casete de autorradiografía sobre las membranas, para exponer la señal quimioluminiscente durante algunos minutos (tiempo variable de acuerdo con el anticuerpo primario utilizado). Para el proceso de revelado, posteriormente a la retirada del casete, se sumerge la misma en una solución reveladora (dilución 1:10) (*Developer/Replenisher*, Agfa-Gevaert Group) hasta que se visualice la señal buscada y en ese momento, se pasa la película al líquido fijador (dilución 1:5) (*Manual Fixing Bath*, Agfa-Gevaert Group) durante algunos segundos con el fin de fijar la señal. Al final, se lava la película con agua corriente y se deja secar para la determinación semicuantitativa de señal.

- Análisis de los resultados: reveladas las películas, se digitalizaron las imágenes mediante un escáner de alta resolución (*CanonScan 9900F*, Canon). Para determinar la cantidad relativa de proteína en cada muestra, se midió la densidad óptica con el software ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband), permitiendo asociar a cada señal la cantidad de proteína presente en la muestra. Eso es posible, debido a la capacidad del software en detectar la cantidad de píxeles de la imagen de la proteína en todas las muestras de una misma película radiográfica. Es importante resaltar que el área de medición debe ser igual para todas las muestras, evitando errores en el análisis de cada muestra. Los valores obtenidos en cada muestra para la proteína estudiada, fueron corregidos de dos maneras, por la densidad óptica de la región adyacente a la señal de cada muestra en las películas fotográficas e igualmente por los niveles de proteína del gen de expresión constitutiva GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), α -tubulina o β -actina. El valor final es normalizado y los resultados fueron expresados como porcentaje de niveles de proteína respecto al grupo control.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
ACC	1:1000	Abcam	ab54174
fosfo-ACC (Ser 79)	1:1000	Cell-Signaling	3661
AKT	1:1000	Cell-Signaling	9272S
PAKT (S473)	1:1000	Cell-Signaling	9271S
AMPKα1	1:1000	Millipore	07-350-25UG
fosfo-AMPKα (Thr 172)	1:1000	Cell-Signaling	2535
ATGL	1:1000	Cell-Signaling	2138
ChREBPα	1:1000	NOVUSBIO	NB400-135
FAS	1:1000	Abcam	ab128870
FGF21	1:1000	Abcam	ab171941

FOXO1	1:1000	Cell-Signaling	2880S
P FOXO1	1:1000	Cell-Signaling	9461S
G6PASA	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	398155
GAPDH	1:1000	Merck	T5168
GCK	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	17819
GLUT2	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	518022
GLUT4	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	53566
PRDM16	1:1000	Abcam	ab106410
HSL	1:1000	Abcam	ab45422
fosfo-HSL (ser 680)	1:1000	Cell-Signaling	4126
IRS1	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	8038
PIRS1	1:1000	Abcam	ab5599
JNK 1/3	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-514539
LPL	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	373759
MTOR	1:1000	Cell-Signaling	2972S
PMTOR	1:1000	Cell-Signaling	2971S
p107	1:500	Abcam	ab2451
PCK1	1:1000	Abcam	ab70358
PGC-1α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-13067
PGSK3	1:1000	Cell-Signaling	9331S
PPAR α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-398394
PPAR γ	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-7273
PRDM16	1:1000	Abcam	ab106410
α-tubulina	1:5000	Sigma	T9026
SCD1	1:1000	Cell-Signaling	2794
SREBP-1c	1:1000	Abcam	ab3259
UCP-1	1:5000	Abcam	ab10983

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para western blot

4.4 PCR A TIEMPO REAL

Los niveles de expresión de ARNm en extractos de tejido fueron determinados cuantitativamente por PCR en tiempo real.

4.4.1 Extracción de ARN

De las muestras de tejido almacenadas a -80°C se cortó una pequeña porción de tejido. El tejido se introduce en un tubo de 2 ml con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf) juntamente con una bola de acero. Seguidamente, se añadieron aproximadamente 500 μl de Trizol (15596018, Invitrogen) sobre los fragmentos de tejido congelado de aproximadamente 50 mg en un tubo de 2 ml y se homogeneizaron mecánicamente con TissueLyser II (Quiagen) durante 4 minutos a 25rpm. Siempre manteniendo las muestras a una temperatura de 4°C para evitar su degradación. Tras la homogenización, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante para nuevos tubos. Después, se añadieron 200 μl de cloroformo, se agitó el tubo de polipropileno por inversión y se incubó aproximadamente durante 3 minutos hasta la división de la muestra en dos capas. Posteriormente, se centrifugaron de nuevo las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Se recogieron y luego se transfirieron las fases acuosas (ARN) a nuevos tubos con cuidado, evitando de tocar la interfase más blanca. Se añadieron 250 μl de isopropanol y tras una agitación se pusieron las muestras 10 minutos a -20°C . Después, se centrifugaron las mezclas a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C , se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado de ARN con etanol al 70%. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se eliminó el

sobrenadante decantando cuidadosamente. Una vez seco, se resuspendió el precipitado en 300 μL de H_2O 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC) calentando las muestras a 60°C por 15 minutos.

4.4.2 Cuantificación del ARN

Se utilizó el equipo *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific) para determinar la concentración y la pureza del ARN. El aparato trabaja con un cociente de absorbancia de 260nm (ARN) y 280nm (proteínas). Para determinar el grado de pureza de la muestra, se analizó la ratio 260/280, considerándose aceptable los valores entre 1,8 y 2. Para determinar la cantidad de ARN extraído, se toma el valor de absorbancia de 260nm. Al determinar la concentración de las muestras, se normalizan todas las muestras a una misma concentración: $0,01\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en el caso del hígado.

4.4.3 Retrotranscripción

A partir del ARN extraído se generaron las formas complementarias de ADN (ADNc). La amplificación y la conversión de la secuencia de ARN a ADN asegura la estabilidad de la molécula durante la PCR en tiempo real. El volumen de los reactivos utilizados se corresponde con un volumen de reacción de 30 μL :

- ❖ 10,00 μL de muestra de $0,01\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ARN
- ❖ 3,58 μL de H_2O 0,1% DEPC
- ❖ 6,00 μL de 100 mM dNTPs (dTTp, dCTp, dGTP, dATp) (10297-018, Invitrogen)
- ❖ 1,50 μL de 25 mM MgCl_2 (A351B, Promega)
- ❖ 1,00 μL de 200 U/ μL M-MLV (28025013, ThermoFisher)
- ❖ 0,25 μL de 40 U/ μL ARNse OUT (10777-019, Invitrogen)
- ❖ 0,17 μL de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Random Primer Mix (48190011, Invitrogen)

La mezcla se incubó en el termociclador con las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos; 37°C durante 50 minutos; 70°C durante 15 minutos.

4.4.4 PCR en tiempo real

Una vez adquirido el ADNc, se determinaron los niveles de ARNm de los genes de interés mediante PCR a tiempo real (RT-PCR), utilizando el equipo *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Esta técnica se basa en la capacidad de detectar el producto de PCR (amplión) en cada ciclo, utilizando fluorescencia. Los resultados obtenidos fueron expresados en términos relativos comparando nuestro gen de interés con un gen control. En esta tesis se utilizó específicamente la técnica de PCR en tiempo real conocida como Sonda cebadora TaqMan.

Sondas Taqman: Es una técnica que se basa en el empleo de sondas específicas unidas a dos fluorocromos: uno, denominado *reporter*, se encuentra unido de forma covalente en el extremo 5' de un oligonucleótido y el otro, un desactivador de fluorescencia (*quencher*) se encuentra en el extremo 3'. El *quencher* inhibe la fluorescencia del *reporter* cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador. Cada sonda específica hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso. A medida que la Taq polimerasa sintetiza en sentido 5'-3', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda quedando separado el fluoróforo del *quencher* y permitiendo así la emisión de la fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADNc de interés presente en el producto de PCR. La mezcla de PCR para este método se calcula para un volumen final de $12\mu\text{L}$ por cada pocillo. El volumen de los reactivos utilizados se corresponde con un volumen de reacción de 12 μL :

- ❖ 6,00 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- ❖ 2,82 μ l de H₂O DEPC
- ❖ 0,36 μ l Sonda Taqman[®]
- ❖ 0,36 μ l Cebador directo 10 μ M (EurofinsDNA)
- ❖ 0,36 μ l Cebador inverso 10 μ M (EurofinsDNA)
- ❖ 2 μ l de muestra ADNc 0,01/0,05 μ g/ μ L

El protocolo usado para la amplificación consistió en 40 ciclos de 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, 10 minutos a 95 °C, 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C en un aparato de PCR en tiempo real 7500 Real Time PCR system (*Applied Biosystems*). Para este trabajo se utilizó la siguiente sonda para detección de p107 en las muestras:

- ❖ Rbl1 (p107) - *Mus musculus* - Taqman Comercial (*Applied biosystems*. Ref. Mm01250721_m1)

5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos fue utilizado el programa estadístico *Prism Software Version 8.0* (GraphPad), en el cual también se han realizado las gráficas de esta tesis. Con el objetivo de conseguir una mejor precisión y evitar conclusiones erróneas, antes del análisis estadístico se identificaron y removieron valores considerados inconsistentes y discrepantes. Este proceso se llevó a cabo a través de una propia herramienta del *software* GraphPad que detecta valores atípicos (*outliers*) dentro de un grupo de muestras (población). Por medio de la prueba de ESD (desviación estudentizada extrema), esta herramienta determina si el valor más extremo dentro del grupo de muestras, es un valor atípico significativo equiparado al resto. La muestra que presentaba un valor anormal cuando era comparada a las demás de su grupo, se eliminaba del análisis estadístico. Además, con anterioridad al análisis estadístico, más precisamente durante el procedimiento experimental, animales que exhibían un comportamiento inadecuado eran identificados y consecuentemente descartados del grupo experimental.

Previamente al análisis estadístico, se realiza un test de normalidad de la distribución de datos, para definir qué test estadístico es más adecuado para la población de interés. Se utilizó el test Shapiro-Wilks cuando $n \geq 7$ y el test de Kolmogorov-Smirnof cuando $n < 6$. En base a lo obtenido en este test, en caso de una distribución normal (Gaussiana), se realizan test estadísticos paramétricos y cuando no pasan el test de normalidad, se realizan test estadísticos no paramétricos. En este trabajo se aplicaron los siguientes tests paramétricos:

- T-Test: Partiendo del punto que el grupo de muestras presenta una distribución normal, este test permite estimar el valor de la media poblacional de una variable aleatoria, cuando el parámetro se saca de una muestra pequeña y no se conoce la varianza poblacional. Antes de la aplicación de la prueba se formulan dos hipótesis, la nula y la alternativa. La hipótesis nula (H_0), afirma que no existe una diferencia significativa entre dos poblaciones. Sin embargo, la hipótesis alternativa (H_1) se contradice a la hipótesis nula, afirmando la existencia de una diferencia significativa. La prueba t puede ser de dos tipos: de dos colas (no direccional) o de una cola (direccional). En la prueba t de dos colas, la diferencia

entre la media de los dos grupos de muestras puede ser positiva o negativa, o sea, la prueba determina si hay una diferencia significativa en cualquier dirección. Por otro lado, en la prueba t de una cola la desigualdad en la hipótesis señala en una sola dirección. La prueba t calcula el estadístico t considerando sus medias de ambas muestras, sus desviaciones estándar y los tamaños de muestra. El siguiente paso es determinar el valor p asociado con el estadístico t calculado. El valor p indica la probabilidad de que haya una diferencia igual o más extrema entre las medias de las dos poblaciones, asumiendo que la hipótesis nula es verdadera. Si el valor p es inferior al nivel de significancia elegido, la diferencia entre las medias de las dos poblaciones es considerada estadísticamente significativa.

- ANOVA de una vía: Determina si existe una diferencia entre las medias de tres o más grupos experimentales asumiendo una distribución normal. Una vez formulada la hipótesis nula y alternativa, se calcula el estadístico f, la relación entre las variaciones entre los grupos y las variaciones dentro de cada grupo. Con el estadístico f calculado, luego se compara con una distribución de probabilidad conocida como distribución f. En base a esta comparación, se determina el valor p. Realizado el test y confirmando diferencias entre las medias, se debe realizar un test a posteriori para comprobar qué medias son las que generan significación. Los test más utilizados son de, Tukey y Bonferroni. El test de Tukey es un método potente y eficiente que compara todas las combinaciones posibles de medias de grupos. Además, es más sensible que el test de Bonferroni, siendo capaz de detectar diferencias significativas con mayor probabilidad cuando el número de grupos es pequeño. El test de Bonferroni es un procedimiento más conservador, que ajusta el nivel de significancia para cada comparación individual, considerando el número total de comparaciones.

Para los grupos que no seguían una distribución normal, se emplearon los siguientes tests no paramétricos:

- Test Mann-Whitney: Cuando dos poblaciones no presentan una distribución normal, se puede comparar la media de estas dos poblaciones, proporcionando un enfoque sólido y sensible.
- Test Krustal-Wallis: Es una prueba utilizada para realizar comparaciones entre múltiples poblaciones, cuando no siguen una distribución normal. Posteriormente, se aplica el test de Dunn para determinar entre qué grupos existen diferencias significativas.

El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento de esta tesis se detalla en los pies de las figuras con los resultados y está representado con la letra “n”. Todos los datos analizados aparecen expresados como la media de los grupos \pm el error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM). En todos los análisis hechos, se consideraron significativos (*) los resultados con una $p < 0,05$; muy significativos (**) con una $p < 0,01$ y extremadamente significativos (***) con $p < 0,001$ y (****) con $p < 0,0001$.

RESULTADOS

1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN GLOBAL DE P107 SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN UN MODELO DE MASLD INDUCIDO POR CDHFD

Datos previos encontrados por nuestro grupo sobre los efectos de la inhibición global de p107 en ratones alimentados con STD y HFD, demuestran un bajo acúmulo lipídico a nivel hepático, una mejora en la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa. Por ello, decidimos estudiar si la delección global de p107 en hígado en estadios más avanzados de la enfermedad hepática también evitaba o retrasaba la enfermedad mediante acciones que afectaban al metabolismo lipídico y de la glucosa tanto en el hígado como en el tejido adiposo blanco. Para ello, alimentamos ratones p107 KO con dieta CDHFD para producir una esteatosis más avanzada.

1.1 RATONES P107 KNOCKOUTS PRESENTAN UN FENOTIPO DELGADO EN CONDICIONES DE CDHFD

En tesis previas de nuestro grupo, fue presentado los efectos de la inhibición global de p107 en ratones alimentados con dieta estándar (STD) o con una exposición prolongada a una dieta alta en grasa (HFD). Pudimos observar que los animales con silenciamiento global de p107 tenían un fenotipo más delgado (Figura 1A y 1B), presentaban una mejor respuesta a la glucosa (Figura 1C y 1D) y tenían una mejor sensibilidad a la insulina (Figura 1E y 1F), tanto los ratones alimentados con STD como con HFD. Además, estos animales presentaban un menor acúmulo de lípidos en el hígado (Figura 1G y 1H).

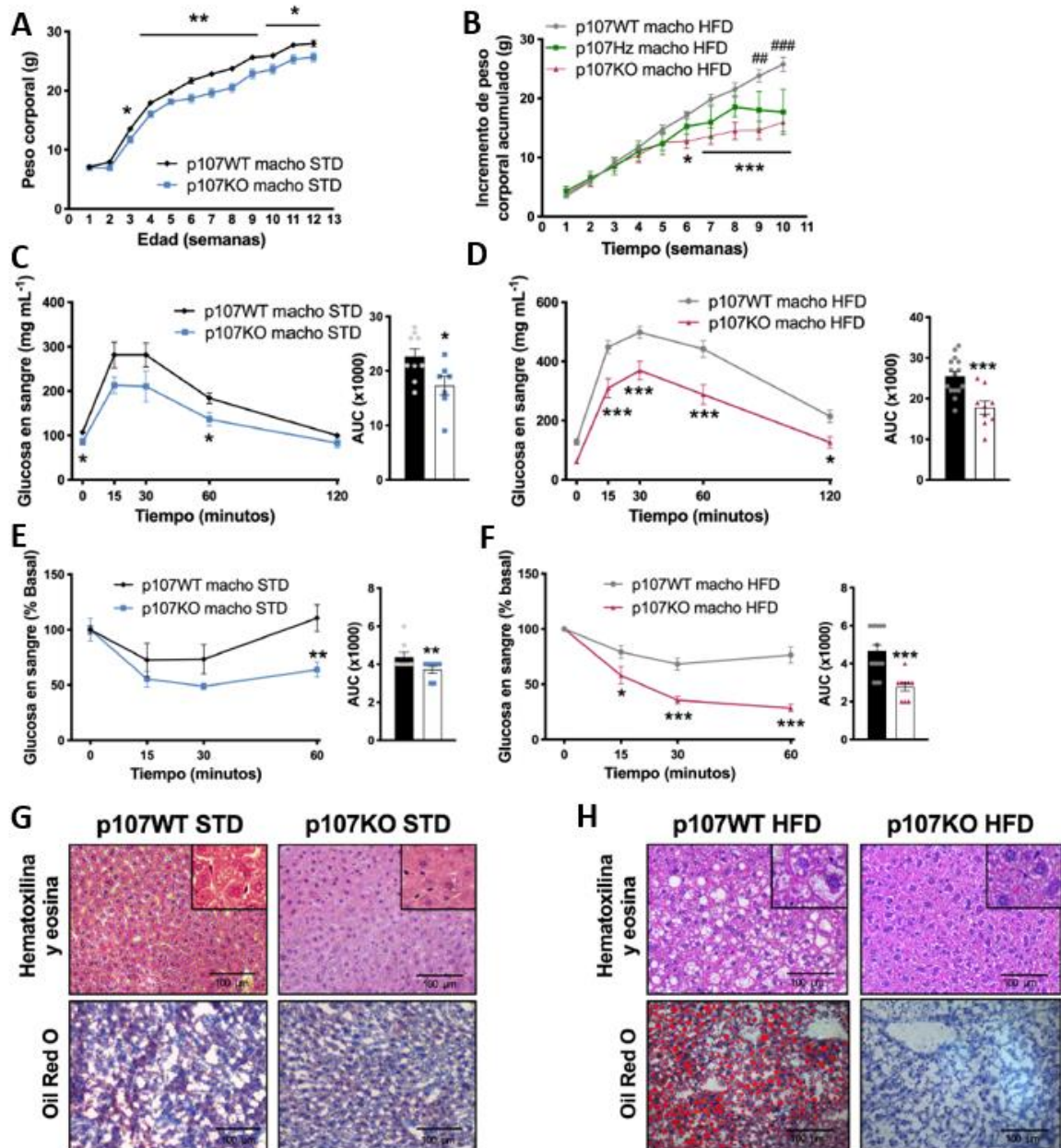


Figura 1. Datos de Juan Cuñarro. La inhibición global de p107 altera el peso corporal, la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y el acúmulo hepático de lípidos tanto en ratones expuestos a STD como en HFD. (A) Promedio del peso corporal de los ratones control (n = 15) y p107KO (n = 10) con una dieta estándar (STD). (B) Incremento de peso corporal acumulado durante 11 semanas con una HFD en ratones control (n = 15) y ratones homocigotos p107KO (n = 9) y ratones heterocigotos p107KO (n = 12). (C) Prueba de tolerancia a la glucosa y su área bajo la curva de ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en STD y (D) en HFD (control n = 9 y p107KO n = 9) a las 9 semanas de edad. (E) Prueba de tolerancia a la insulina y su área bajo la curva en ratones control (n = 7) y p107KO (n = 7) en STD y (F) en HFD (control n = 9 p107 ratones KO n = 9) a las 10 semanas de edad. (G) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones control (n = 7) y ratones p107KO (n = 7) en STD y (H) en HFD (control,

n = 9; p107KO, n = 9). Los datos se expresan como media \pm SEM. Después de aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones control y p107 KO.

Con estos datos, decidimos exponer ratones p107 KO a una dieta CDHFD. A partir de las 4 semanas de edad (destete), monitorizamos por 17 semanas el peso corporal de los ratones p107 KO y de sus controles WT compañeros de camada alimentados con una dieta alta en grasa y deficiente en colina (CDHFD). Este análisis nos reveló que durante las primeras 10 semanas de dieta CDHFD, el peso corporal se mantenía similar. Sin embargo, tras las 10 semanas los ratones p107 KO empezaron a demostrar significativamente un menor incremento de ganancia de peso comparado con los controles después de la exposición a CDHFD (Figura 2A). Esta diferencia fue observada de forma más evidente, al final del estudio con la composición corporal mediante la resonancia magnética. Los resultados indicaban que los ratones p107 KO tenían una menor cantidad de masa grasa y mayor cantidad de masa no grasa (masa magra) al exponerse a una dieta CDHFD (Figura 2B).

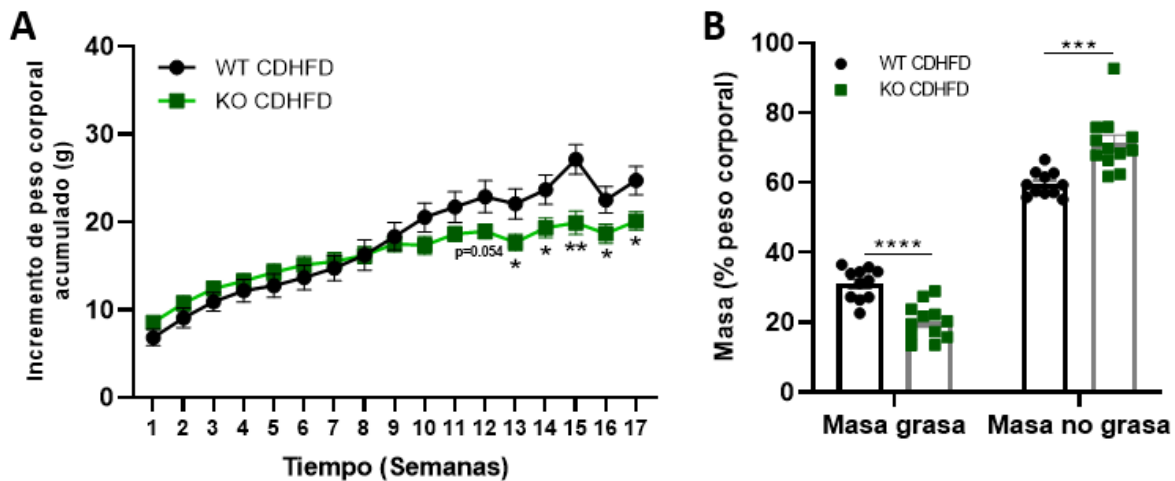


Figura 2. La inhibición global de p107 altera el peso corporal de ratones expuestos por 17 semanas en CDHFD. (A) Incremento de peso corporal durante 17 semanas con CDHFD, WT (n = 11) y KO (n = 12). (B) Composición de masa grasa y no grasa en los ratones WT (n = 11) y KO (n = 12) al final del experimento, 17 semanas con CDHFD. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ entre los ratones WT y KO.

Al confirmar que los ratones deficientes en p107 son resistentes al incremento de peso producido por la dieta CDHFD, decidimos estudiar en detalle su impacto en la homeostasis de la glucosa. Inicialmente, medimos los niveles de glucosa en sangre en ratones alimentados *ad libitum* (Figura 3A) y sometidos a un ayuno de 12 horas (Figura 3B). No encontramos diferencias significativas en los niveles de glucosa entre los ratones alimentados *ad libitum*, tampoco en un período de ayuno.

Para analizar su tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina y al piruvato, realizamos GTT, ITT y PTT. De esta forma, pudimos observar que tanto en la GTT (Figura 3C), la ITT (Figura 3D), como PTT (Figura 3E) los ratones p107 KO mostraron unos niveles de glucosa más bajos comparados con los ratones WT, indicando una mayor sensibilidad a la insulina y una menor producción de glucosa a partir del piruvato.

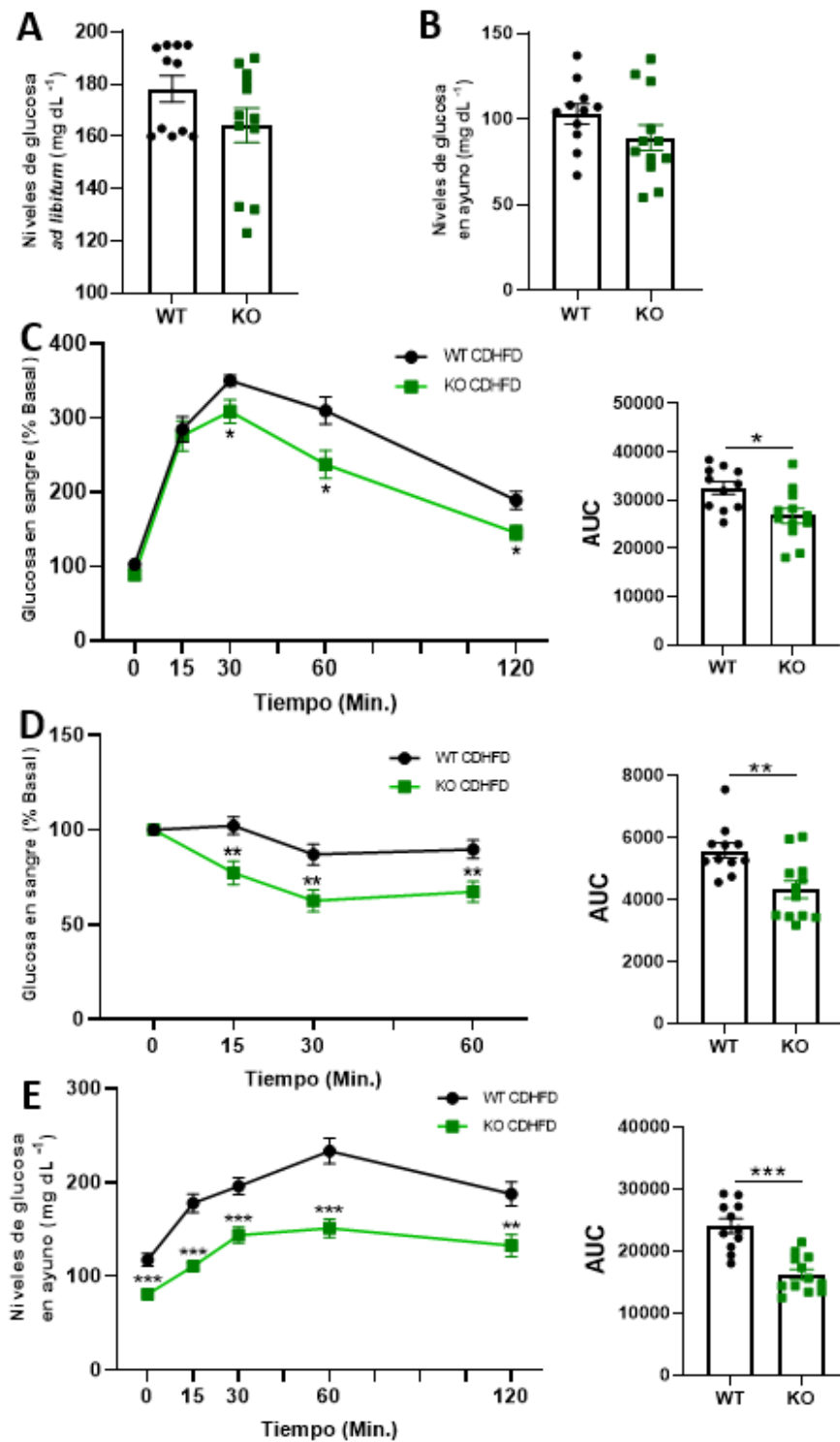


Figura 3. Los ratones con inhibición global de p107, tratados con CDHFD presentan una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. (A) Concentración de glucosa en sangre de ratones WT (n = 11) y KO (n = 12) con 12 semanas en CDHFD. (B) Concentración de glucosa en sangre después de un ayuno de 12h en ratones WT (n = 11) y KO (n = 12). (C) Prueba de tolerancia a la glucosa y su área bajo la curva de ratones WT (n = 11) y KO (n = 12). (D) Prueba de tolerancia a la insulina y su

área bajo la curva en ratones WT (n = 11) y KO (n = 12). (E) Prueba de tolerancia al piruvato y su área bajo la curva de ratones WT (n = 11) y KO (n = 12). Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones WT y KO.

A nivel lipídico, al realizar el análisis de los niveles circulantes de colesterol y TG observamos menores niveles en los ratones KO siendo estadísticamente significativos (Figura 4A y 4B).

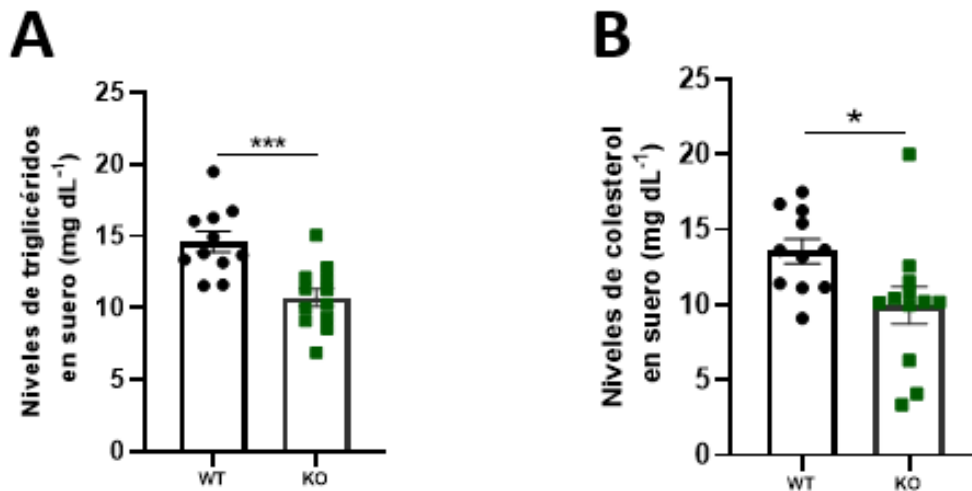


Figura 4. Los ratones p107 KO, tratados con CDHFD presentan niveles circulantes de lípidos más bajos que sus controles. (A) Niveles de TG en suero de ratones WT (n = 11) y KO (n = 12). (B) Niveles de colesterol en suero de ratones WT (n = 11) y KO (n = 12). Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones WT y KO.

1.2 RATONES P107 KO PRESENTAN UNA RESISTENCIA A LA ESTEATOSIS Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO

Lo siguiente fue analizar el metabolismo hepático, y para ello lo primero fue analizar los depósitos de grasa en hígado, utilizamos las técnicas histológicas de H-E y Oil Red O. Fue observada una menor acumulación lipídica en hígado de los ratones p107 KO (Figura 5A), que estaba en concordancia con la clara disminución del contenido hepático de triglicéridos comparado a los controles WT (Figura 5B). Sin embargo, no encontramos diferencias en los acúmulos de colágeno detectados por la tinción *Sirius Red*, en los ratones p107 KO alimentados con CDHFD comparados a sus controles (Figura 5C).

A partir de ahí realizamos el análisis molecular para analizar con más detalle las posibles rutas implicadas en el proceso de resistencia al acúmulo de grasa hepática característico de los ratones p107 KO. En el primer momento, evaluamos los niveles proteicos de diferentes factores de transcripción y enzimas clave en la LDN. Como esperado y de forma similar a lo que fue descrito en el ratón KO global alimentado con HFD, se observó una disminución significativa de FAS, ACC, pACC, ChREBP1 y SREBP1 (Figura 5D). Por otro lado, PPAR γ un FT central requerido para la adipogénesis, presentó un incremento en los ratones p107 KO.

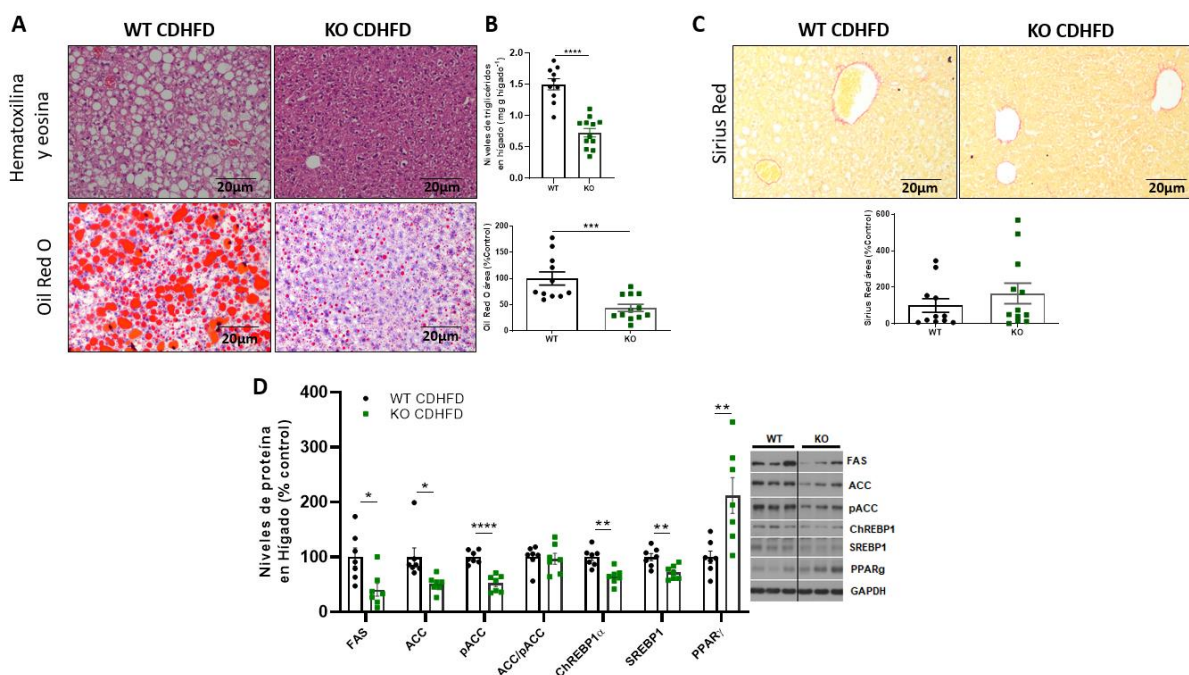


Figura 5. La inhibición global de p107 protege contra la esteatosis inducida por CDHFD y mejora el metabolismo lipídico. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones y cuantificación de la tinción Oil Red O, WT (n = 11) y ratones KO (n = 12). (B) Niveles de triglicéridos hepáticos, WT (n = 11) y ratones KO (n = 12). (C) Tinción representativa de Sirius Red de secciones de hígado de ratones y cuantificación de la tinción Sirius Red, WT (n = 11) y ratones KO (n = 12). (D) Expresión de proteínas del metabolismo de lípidos como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1 y PPAR γ en hígado de ratones WT (n = 7) y KO (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ entre los ratones WT y KO.

Centrándonos en la oxidación de AGs y en la lipólisis, fueron estudiados algunos de los marcadores más relevantes. Fueron observados cambios en PPAR α y en HSL, proteínas implicadas en la lipólisis de TG y la β -oxidación (Figura 6A). No se observó alteración en los niveles de PGC1 α de los p107 KO comparado a los controles.

Debido a una alteración sistémica de los niveles de glucosa observados en los experimentos de GTT, ITT y PTT, realizamos un análisis de la expresión de diferentes proteínas esenciales en el metabolismo de la glucosa en hígado. El dato más relevante, fue el incremento significativo de pAKT (Figura 6B). Este incremento de la fosforilación de AKT se correlaciona con lo que fue encontrado a nivel sistémico. Los ratones p107 KO presentan una respuesta más eficiente a la administración de glucosa y una mejor sensibilidad a la insulina. Esto indica que durante la elevación de glucosa plasmática, la insulina secretada por el páncreas, actúa en el hígado activando la vía PI3K-AKT. De esta forma, la fosforilación de AKT en el hígado desempeña un papel esencial en el control de la gluconeogénesis, en la promoción de la glucogénesis y en la gestión del metabolismo de la glucosa en general. Su adecuada regulación es esencial para prevenir desequilibrios energéticos y condiciones metabólicas perjudiciales. Otro dato observado, fue la disminución de la expresión de mTOR y pmTOR. Un resultado sorprende, ya que la activación de la vía PI3K-AKT actúa directamente en la ativación de mTOR.

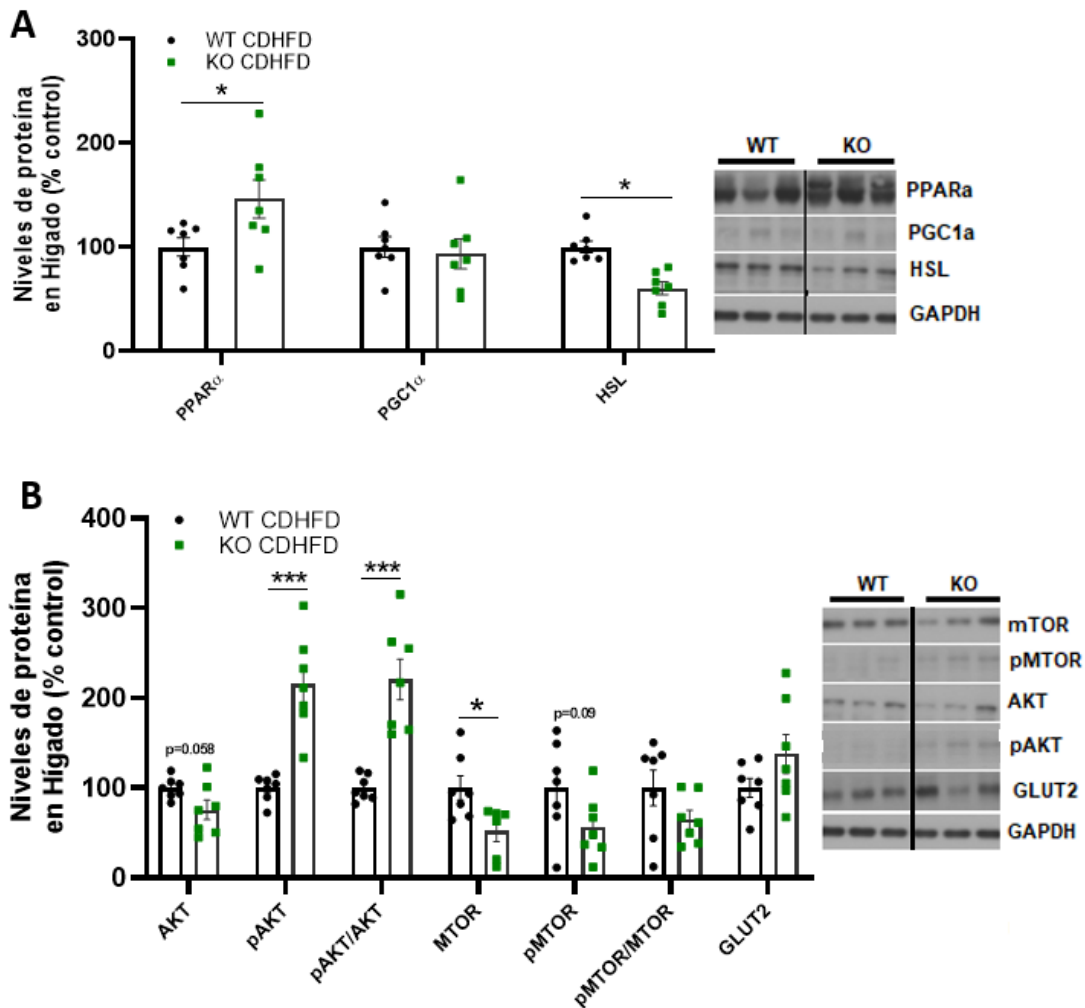


Figura 6. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (A) marcadores lipolíticos como PPAR α , PGC1 α y HSL; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, mTOR, pMTOR, GLUT2 en hígado de ratones WT (n = 7) y KO (n = 7) en CDHFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, *** p \leq 0.001 entre los ratones WT y KO.

1.3 RATONES P107 KO CON CDHFD PRESENTAN CAMBIOS EN PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Lo siguiente fue realizar un estudio del tejido adiposo. Mediante tinción H-E evaluamos el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco epididimal de los ratones p107 KO y sus controles. Aunque, no se observa una diferencia significativa de tamaño de estos adipocitos, se nota una tendencia de disminución de los adipocitos de los ratones p107 KO (Figura 7A). En el análisis molecular, observamos un incremento de proteínas involucradas en la lipogénesis de los adipocitos como, ChREBP1, SREBP1 y PPAR γ (Figura 7B). Sin embargo, FAS y ACC no demuestran ningún tipo de cambio en los ratones p107 KO.

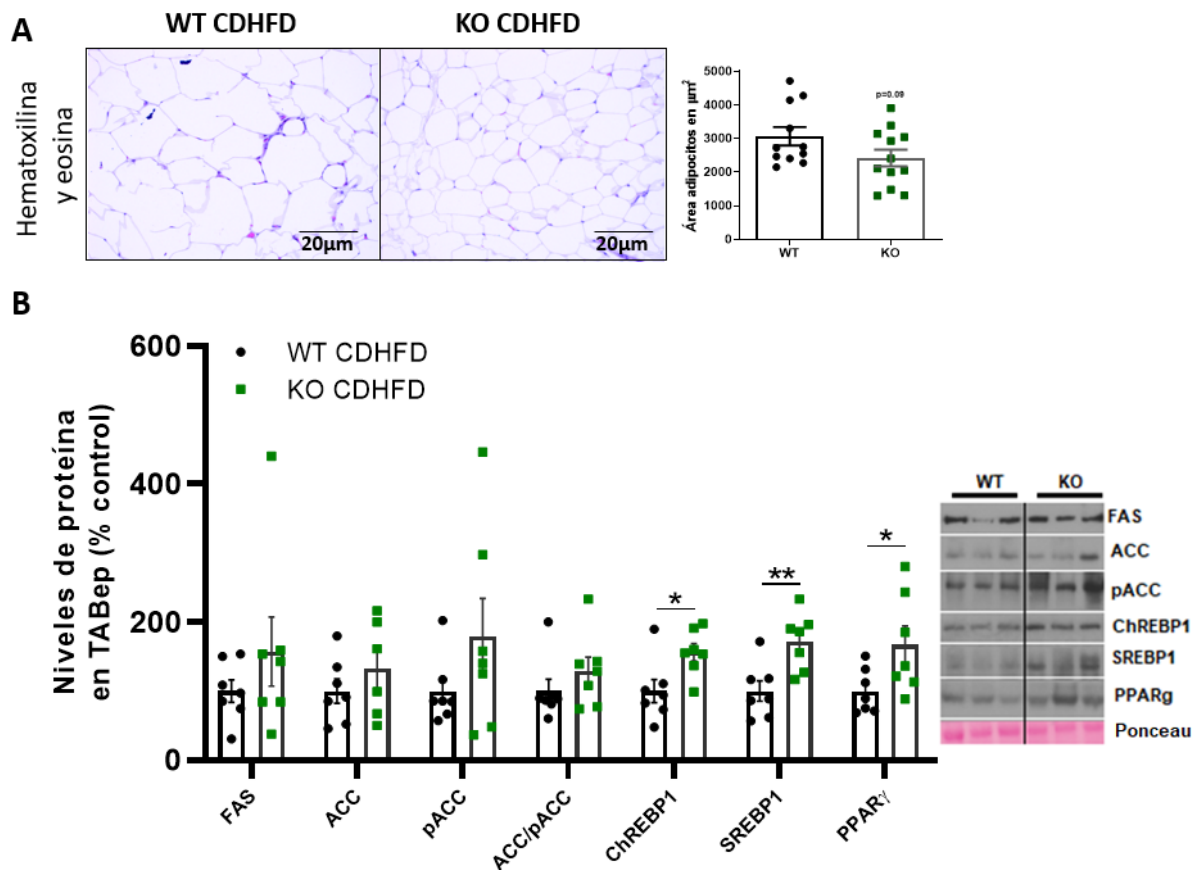


Figura 7. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina del adipocito epididimal y tamaño de los adipocitos (μm^2). **(B)** Cuantificación e imágenes representativas obtenidas del western blot de marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1 y PPAR γ . Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ entre los ratones WT y KO.

Con relación a los marcadores lipolíticos, podemos ver un aumento significativo en PPAR α de los ratones p107 KO (Figura 8A). Lo que puede indicar una transcripción de genes implicados en la oxidación mitocondrial y peroxisomal, un aumento del uso oxidativo de los lípidos y una posible reducción de la inflamación en los adipocitos promoviendo un perfil metabólico más estable. Por último, notamos un incremento de pAKT, pMTOR, en los ratones p107 KO (Figura 8B). El incremento de estas proteínas puede promover variados beneficios a los ratones p107 KO. AKT y mTOR son capaces de activar SREBP-1c, que regula la expresión de genes lipogénicos, como ACC y FAS. Esto da como resultado un aumento de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en el tejido adiposo, lo que contribuye a un almacenamiento eficiente de energía. Además, AKT fosforila e inactiva HSL, reduciendo la degradación de triglicéridos y permitiendo el almacenamiento de lípidos. Otro efecto importante generado por estas dos proteínas, es la redistribución de lípidos desde el hígado a los adipocitos, evitando la acumulación de lípidos en el hígado y el desarrollo de resistencia hepática a la insulina. Por último pero no menos importante, AKT y mTOR facilitan la captación de glucosa y el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo, reduciendo los niveles circulantes de glucosa y ácidos grasos libres.

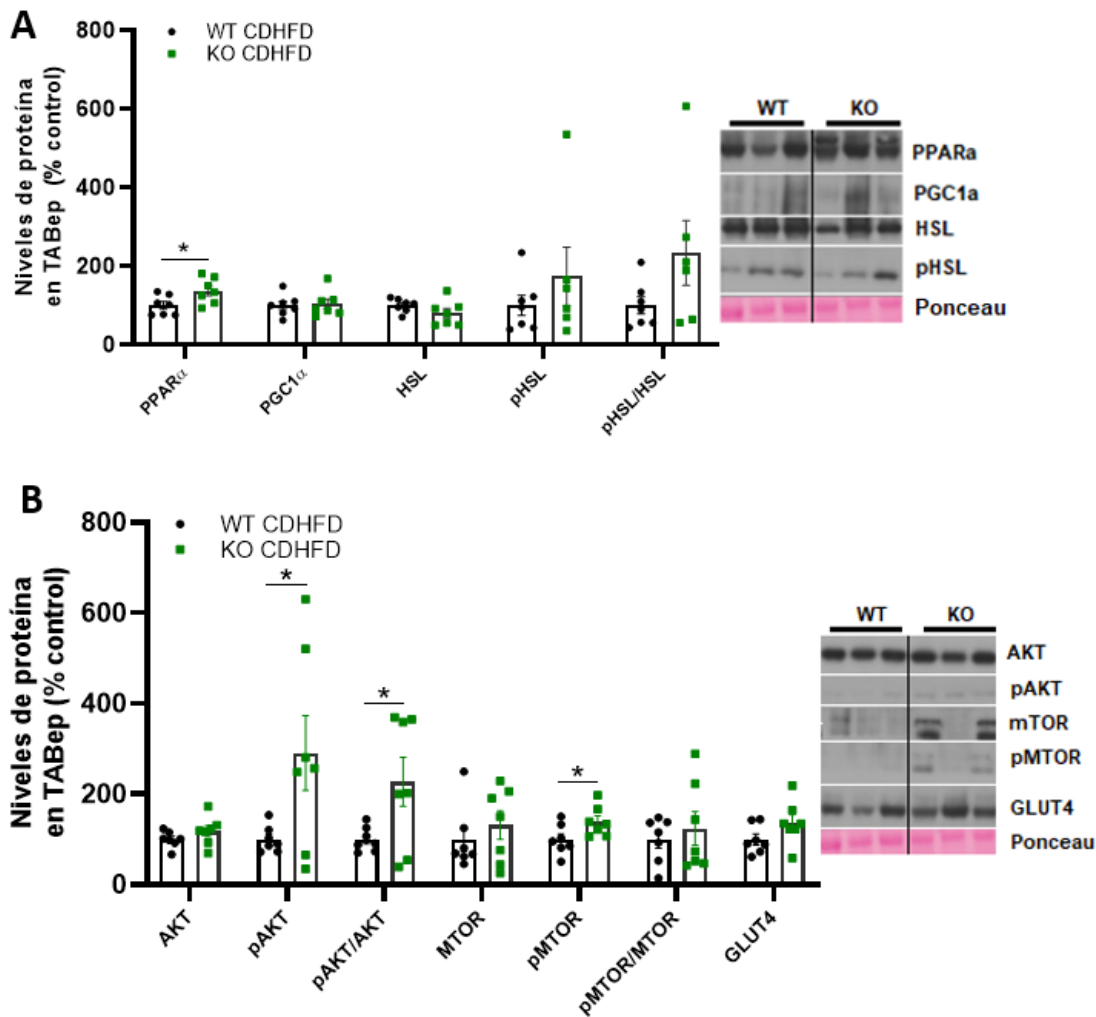


Figura 8. (A) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipolíticos como PPAR α , PGC1 α , HSL y pHSL; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, mTOR, pMTOR y GLUT4 en TABep de ratones WT (n = 7) y KO (n = 7) en CDHFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, entre los ratones WT y KO.

Lo siguiente fue evaluar el tejido adiposo blanco subcutáneo de los ratones p107 KO y sus controles. En concordancia con lo que observamos en la resonancia magnética de estos animales, los adipocitos subcutáneos de los ratones p107 KO presentan una disminución de tamaño cuando los comparamos a los controles (Figura 9A). Eso era esperado, ya que los animales p107 KO presentan un fenotipo más delgado. En el estudio molecular encontramos un aumento en la mayoría de las enzimas de la LDN, como ACC, pACC, SREBP1 y PPAR γ (Figura 9B). Con el incremento de la lipogénesis *de novo* en TABsc, la glucosa y los lípidos exógenos (como los de la dieta) se dirigen al tejido adiposo, donde se convierten en ácidos grasos y se almacenan como triglicéridos. Esto disminuye la cantidad de ácidos grasos libres disponibles para el hígado.

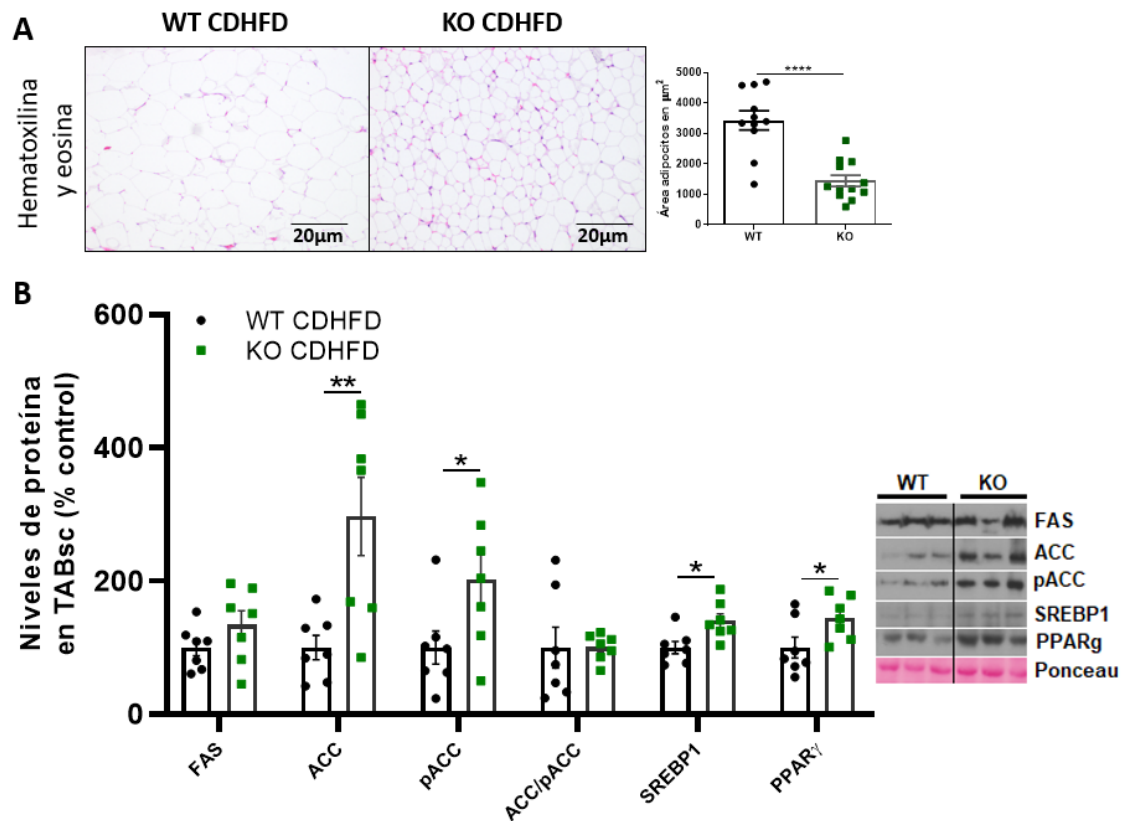


Figura 9. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina del adipocito subcutáneo y tamaño de los adipocitos (μm^2). Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (B) marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, SREBP1 y PPAR γ . Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$ entre los ratones WT y KO.

Centrándonos en la oxidación de AGs y en la lipólisis, se midieron los niveles de expresión de proteínas implicadas en estos mecanismos. Encontramos un incremento significativo de los niveles de PPAR α , LPL y ATGL en los p107KO (Figura 10A). Esto evidencia una redistribución de la grasa, o sea, los adipocitos subcutáneos secuestran los lípidos de la circulación antes de que lleguen al hígado y ocurra una acumulación. Medimos también las proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa en TABsc. Vimos que los niveles de Glut4 están aumentados en este tejido (Figura 10B). Los niveles elevados de Glut4 mantienen niveles más bajos de glucosa plasmática, aliviando la carga metabólica en el hígado y el páncreas. Además, eso demuestra un posible papel de protección contra la intolerancia a la glucosa, ejercido por TABsc para la manutención de la homeostasis sistémica de la glucosa.

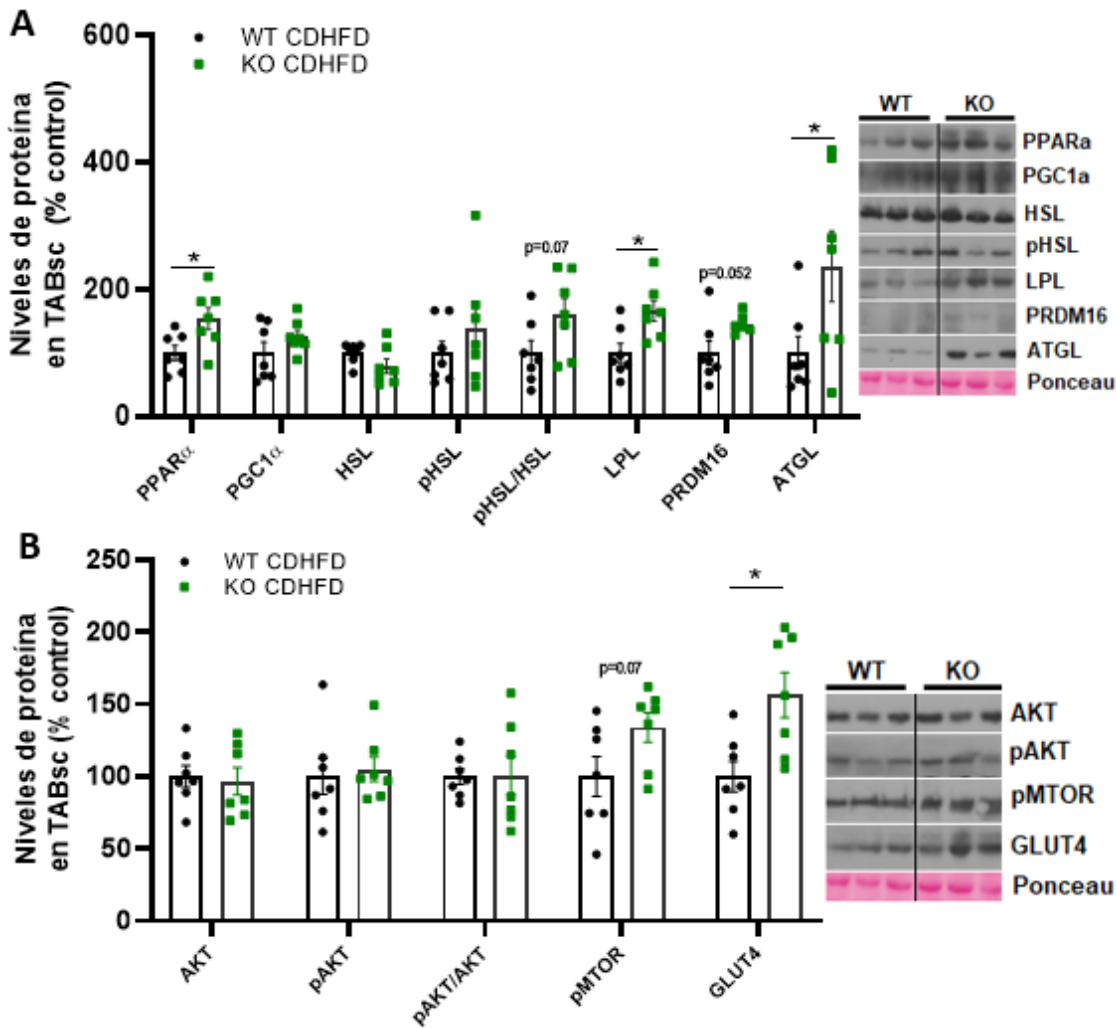


Figura 10. (A) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipolíticos como PPAR α , PGC1 α , HSL, pHSL, LPL, PRDM16 y ATGL; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, pMTOR y GLUT4, en TABsc de ratones WT (n = 7) y KO (n = 7) en CDHFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05 entre los ratones WT y KO.

2 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE p107 EN HÍGADO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN UN MODELO DE ESTEATOSIS INDUCIDO POR HFD

Con los resultados previos demostrados y publicados por nuestro grupo sobre los efectos de la inhibición global de p107, quisimos comprobar la aportación de la deficiencia de p107 únicamente en el hígado sobre la resistencia a la esteatosis, sobre el tejido adiposo y la comunicación entre ellos. Analizamos tanto al metabolismo lipídico como al almacenamiento en el hígado y el metabolismo de lípidos y glucosa en el tejido adiposo blanco (TAB). Primeramente se utilizó un modelo de esteatosis hepática inducida por dieta HFD.

2.1 LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES OBESOS NO AFECTA EL PESO CORPORAL, SIN EMBARGO DISMINUYE LOS NIVELES DE GLUCOSA PLASMÁTICA

Para averiguar si la inhibición específica de p107 en hígado generaba una resistencia a la ganancia de peso corporal, tras la administración del lentivirus, los animales pasaron a tener acceso a la dieta HFD durante 11 semanas. Para comprobar la eficiencia de la inyección de los lentivirus, realizamos RT-PCR confirmando la inhibición de p107 específica en hígado (Figura 11A). Tras la administración del lentivirus, monitorizamos el peso corporal de los ratones shp107 y de sus controles shLuciferasa todas las semanas sin encontrar cambios significativos en el peso a lo largo del experimento (Figura 11B).

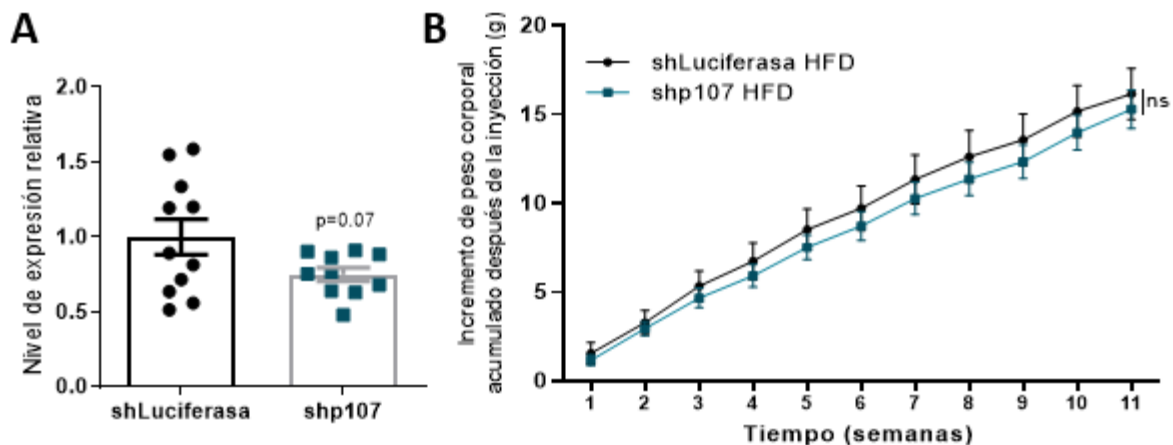


Figura 11. La inhibición específica de hígado de p107 no altera el peso corporal de ratones expuestos por 11 semanas en HFD. (A) Nivel de expresión relativa de p107 en hígado de ratones shLuciferasa (n = 11) y shp107 (n = 10). (B) Incremento de peso corporal durante once semanas, ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8).

Por otra parte, y para realizar una caracterización completa del ratón y la posible implicación de p107 en la homeostasis de la glucosa, a la décima semana *post* inyección realizamos tanto mediciones de glucosa en *ad libitum* y en ayuno como GTT e ITT. Los resultados mostraron una disminución en los niveles de glucosa en los ratones shp107

comparados con los controles tanto en *ad libitum* (Figura 12A) como en ayuno (Figura 12B), siendo en ambos casos estadísticamente significativa. Sin embargo, los resultados de la GTT (Figura 12C) no demostraron cambios significativos en los niveles de glucosa en sangre entre los dos grupos a lo largo de los 120 min. Igualmente, no se observó diferencias entre los niveles de glucosa en la prueba de tolerancia a la insulina, ITT (Figura 12D).

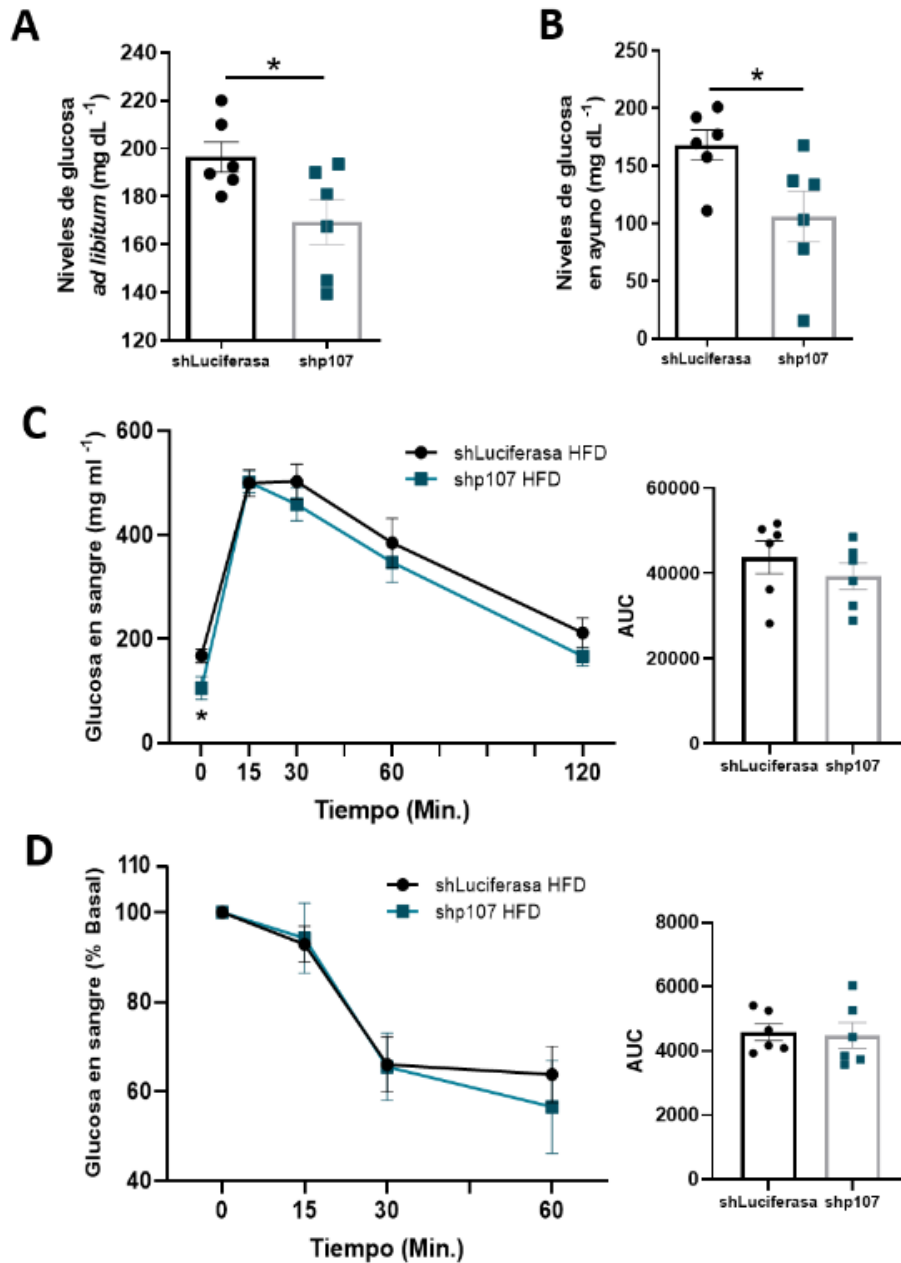


Figura 12. La inhibición específica de hígado de p107 altera los niveles de glucosa de ratones expuestos por 11 semanas en HFD. (A) Concentración de glucosa en sangre de ratones shLuciferasa (n = 6) y shp107 (n = 6). (B) Concentración de glucosa en sangre después de un ayuno de 12h en ratones shLuciferasa (n = 6) y shp107 (n = 6). (C) Prueba de tolerancia a la glucosa y su área bajo la curva de ratones shLuciferasa (n = 6) y shp107 (n = 6) a la última semana de dieta. (D) Prueba de tolerancia a la insulina y su área bajo la curva en ratones shLuciferasa (n =6) y shp107 (n = 6) a la

última semana de dieta. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Para evaluar el estado metabólico, se midieron los niveles de triglicéridos y de colesterol en suero. Se observó que los ratones shp107 manifestaron una tendencia de disminución de estos lípidos circulantes (Figura 13A y 13B), aunque sin ser estadísticamente significativa. Dada la relevancia de la comunicación y flujos de sustratos metabólicos entre los principales órganos implicados en la homeostasis energética y metabólica, estos experimentos iniciales fueron desarrollados con el objetivo de evaluar el impacto sistémico y el cambio de metabolitos circulantes consecuentes de la inhibición de p107 en el hígado. Sin embargo, diferente de lo que se observó en los datos con ratones p107 KO globales, la inhibición específica de p107 en hígado no parece afectar significativamente el fenotipo y los niveles circulantes de lípidos en estos animales. Aunque se note una bajada sistémica de glucosa, no se observa una mejora en la respuesta a la insulina en los animales shp107.

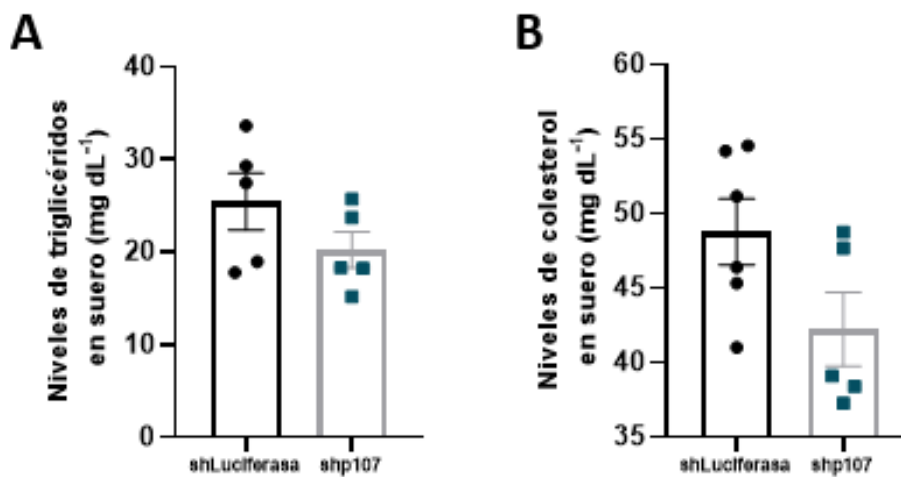


Figura 13. La inhibición específica de hígado de p107 no altera los niveles circulantes de lípidos de ratones expuestos por 11 semanas en HFD. (A) Niveles de TG en suero de ratones shLuciferasa (n = 5) y shp107 (n = 5). (B) Niveles de colesterol en suero de ratones shLuciferasa (n = 6) y shp107 (n = 5).

2.2 LA INHIBICIÓN DE P107 EN HÍGADO DE RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA PRODUCE UNA RESISTENCIA A LA ESTEATOSIS Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO

Para evaluar el efecto de la deficiencia de p107 en el metabolismo lipídico en hígado, analizamos mediante H-E y mediante la tinción oil-Red los depósitos de grasa, que nos han permitido visualizar una menor acumulación lipídica en hígado de los ratones con inhibición de p107 hepática (Figura 14A). Por otra parte pudimos observar una clara disminución del contenido hepático de triglicéridos, lo que demuestra una prevención frente a la esteatosis hepática en los ratones shp107 (Figura 14B).

Para analizar la evolución de la enfermedad hepática con la dieta alta en grasa y para detectar alguna aparición de fibrosis, se utilizó la tinción *Sirius Red* para detectar la acumulación de colágeno característicos en la evolución de MASLD a MASH (Figura 14C). Aunque no estadísticamente significativos, se observa una tendencia de menor acúmulo de colágeno en los ratones shp107 alimentados con HFD. Los datos histomorfológicos revelan que

a nivel hepático, la inhibición de p107 promueve una resistencia al acúmulo lipídico que consecuentemente previene una progresión de la estosis hepática en estos animales.

A la vista de esos resultados encontrados, quisimos ahondar en más detalle en las rutas moleculares que podrían estar implicadas en el proceso de resistencia al acúmulo de grasa hepática. Para ello, inicialmente, estudiamos los niveles proteicos de diferentes enzimas clave en la LDN, así como los factores de transcripción que intervienen en su regulación. Como esperado y de forma similar a lo que fue descrito en el ratón KO global, la inhibición de p107 en el hígado produjo una disminución de las principales enzimas y FTs de la LDN como FAS, pACC, ChREBP1, SREBP1 y SCD1 (Figura 14D). Por otra parte, PPAR γ un FT central requerido para la adipogénesis, no presentó ningún tipo de alteración.

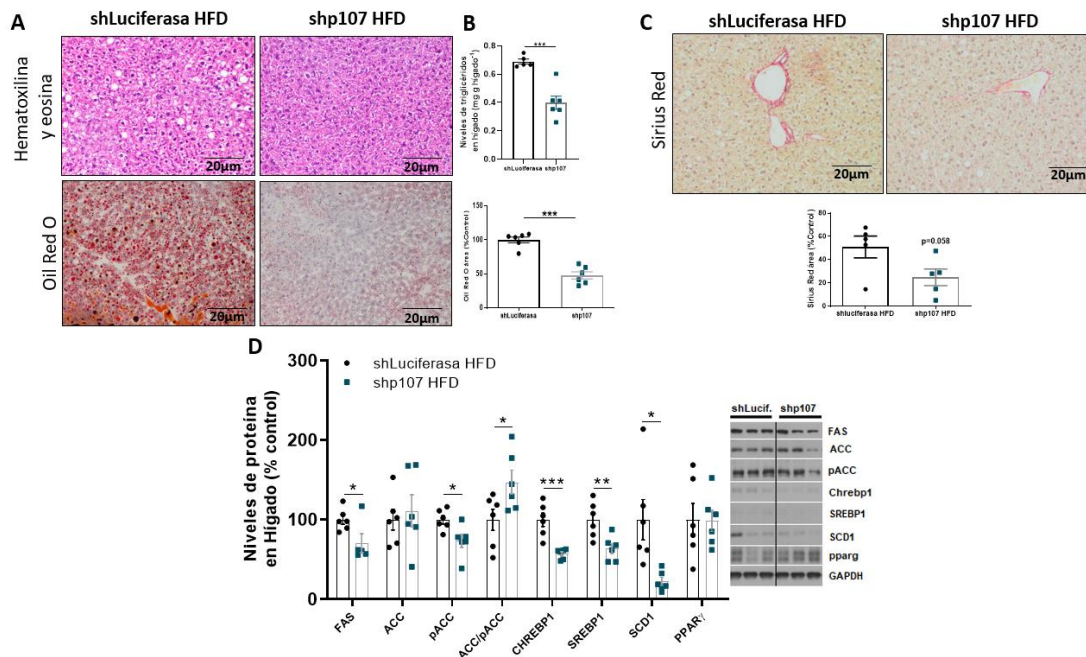


Figura 14. La inhibición específica de hígado de p107 protege contra la esteatosis inducida por HFD y mejora el metabolismo lipídico. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones y cuantificación de la tinción Oil Red O, shLuciferasa (n = 6) y ratones shp107 (n = 6). (B) Niveles de triglicéridos hepáticos, shLuciferasa (n = 5) y ratones shp107 (n = 6). (C) Tinción representativa de Sirius Red de secciones de hígado de ratones y cuantificación de la tinción Sirius Red, shLuciferasa (n = 5) y ratones shp107 (n = 5). (D) Expresión de proteínas del metabolismo de lípidos como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1, SCD1 y PPAR γ en hígado de ratones shLuciferasa (n = 6) y shp107 (n = 6) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Para estudiar si la disminución del acúmulo de grasa hepática, podría ser también consecuencia de un incremento de la lipólisis o de la β -oxidación, fueron analizados algunos de los marcadores más relevantes. Sin embargo, solo se observaron cambios, en una proteína implicada en la lipólisis de TG y la β -oxidación, PRDM16 cuya expresión se incrementaba (Figura 15A). Los otros marcadores como PPAR α , PGC1 α , HSL, pHSL y ATGL, no se alteraron significativamente comparado a los controles.

Dado los datos obtenidos en los niveles circulantes de glucosa, quisimos realizar un análisis de la expresión de diferentes proteínas esenciales en el metabolismo de la glucosa en

hígado. De forma interesante, observamos una clara activación de pPDH, GLUT2, GCK y PCK1 (Figura 15B). Eso nos lleva a hipotetizar que la inhibición de p107 específica en hígado, parece incrementar la captación celular de glucosa con la activación de los transportadores de glucosa GLUT2, con el aumento de la fosforilación de AKT y con la expresión de pPDH, GCK y PCK1, enzimas importantes en la regulación del metabolismo de la glucosa. Estos resultados demuestran un posible efecto positivo de la ausencia de p107, a que la activación de AKT es importante para la regulación del metabolismo de glucosa y de la grasa.

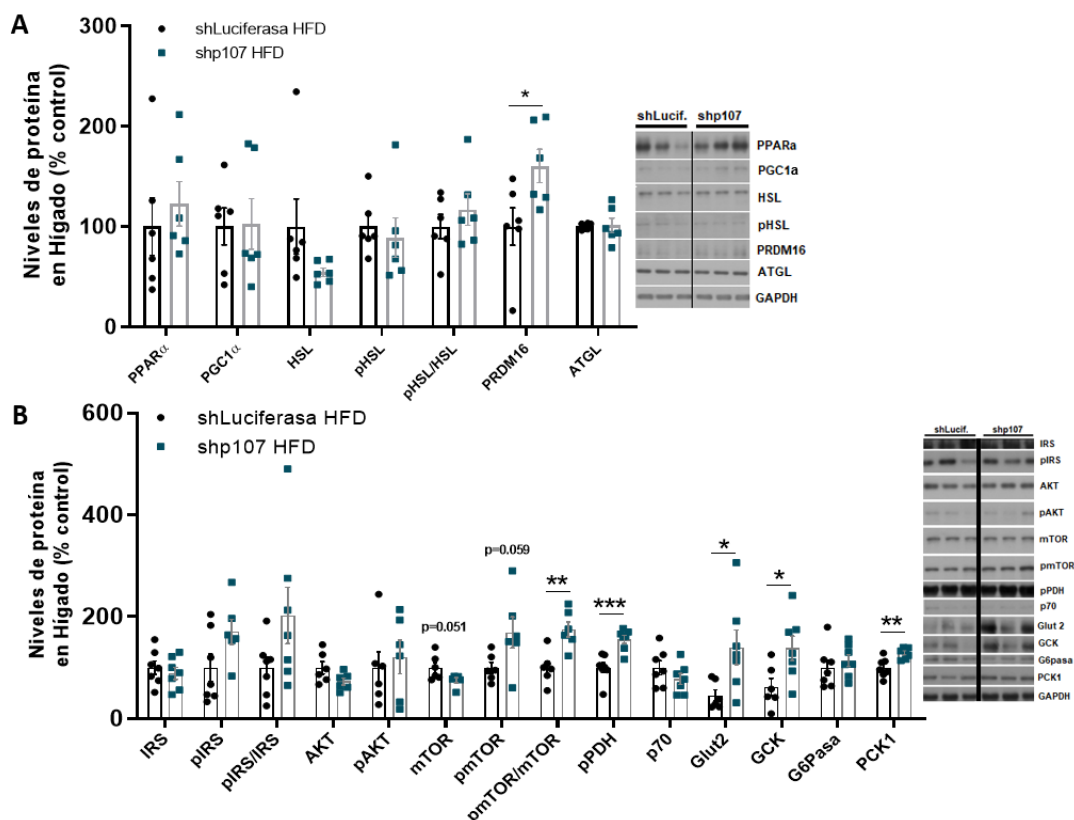


Figura 15. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (A) marcadores lipolíticos como PPAR α , PGC1 α , HSL, pHSL, PRDM16 y ATGL; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como IRS, pIRS, AKT, pAKT, mTOR, pmTOR, pPDH, p70, GLUT2, GCK, G6Pasa y PCK1 en hígado de ratones shLuciferase (n = 7) y shp107 (n = 7) en HFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 entre los ratones shLuciferase y shp107.

2.3 LA INHIBICIÓN DE P107 EN HÍGADO DE RATONES CON HFD PRODUCE CAMBIOS EN PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA EN EL TEJIDO ADIPOSITO

Los niveles de grasa hepática están determinados por la cantidad de lípidos que el hígado produce o absorbe de la circulación (provenientes de la alimentación o de la lipólisis del tejido adiposo blanco), y de la capacidad del hígado para exportarlos o metabolizarlos. Además, el tejido adiposo blanco (TAB) es fundamental para determinar los flujos de lípidos al hígado tanto en un estado de ayuno como en un estado de alimentación.

Dada esta relación entre tejido adiposo e hígado y como la inhibición específica de p107, modifica las rutas de metabolismo de lípidos y glucosa en el hígado, quisimos averiguar si también tendría efectos sobre el tejido adiposo blanco epididimal y subcutáneo, considerando

que el equilibrio entre estos tejidos y el hígado es esencial. Ya que los ratones con inhibición de p107 en hígado son resistentes a un acúmulo de grasa en hígado, esperábamos todavía un cambio más robusto en las rutas de metabolismo de glucosa y de lípidos en el tejido adiposo blanco (TAB).

Inicialmente mediante análisis histomorfológico mediante tinción H-E evaluamos el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco epididimal de los ratones shp107 y sus controles. Sin embargo, no observamos diferencias significativas de tamaño de estos adipocitos (Figura 16A). Al realizar el análisis molecular, observamos que la inhibición de p107 en hígado produce un incremento de proteínas involucradas en la lipogénesis de los adipocitos blancos epididimales (Figura 16B). Curiosamente, como el hígado también puede enviar señales al tejido adiposo blanco para modular el metabolismo lipídico, eso nos sugiere, la presencia de un posible mecanismo compensatorio que evitaría la activación de la LDN en hígado impidiendo el acúmulo de grasa en el tejido hepático.

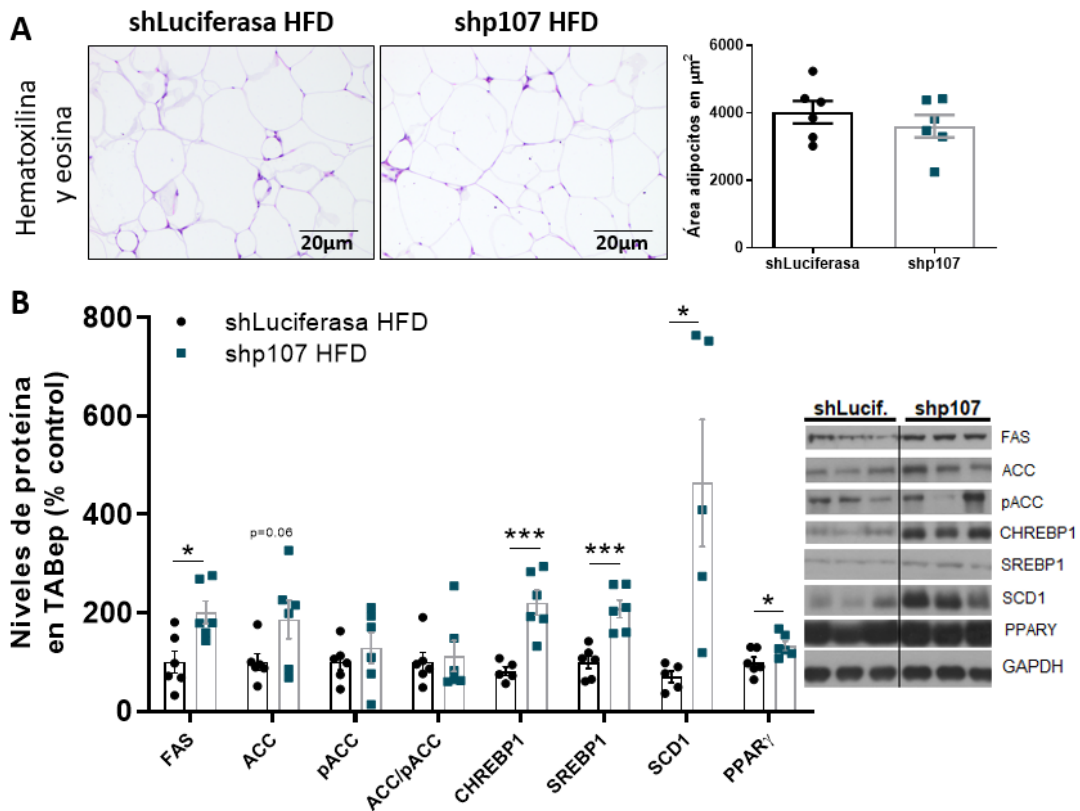


Figura 16. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina del adipocito epididimal y tamaño de los adipocitos (µm²). **(B)** Cuantificación e imágenes representativas obtenidas del western blot de marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1, SCD1 y PPAR γ . Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

En cuanto a las proteínas implicadas en la lipólisis, solamente vimos un claro incremento estadísticamente significativo en ATGL sin cambios en el resto de las proteínas estudiadas (Figura 17A).

Para ahondar aún más en la caracterización, analizamos la expresión de varias proteínas relacionadas con la regulación de glucosa. Encontramos un incremento significativo en los

ratones shp107 de mTOR, pmTOR, FOX01, y pFOX01 en TABep (Figura 17B). Dentro de los adipocitos, FOX01 está caracterizado por regular la homeostasis energética a través de la modulación del tamaño de los adipocitos y las adaptaciones a la ingesta calórica ya que la vía mTOR, controla el metabolismo de los lípidos y la formación y el mantenimiento de los adipocitos. Datos muy consistentes que demuestran la relevancia de p107 en hígado y sus efectos en diferentes tejidos que están involucrados en el metabolismo lipídico y de glucosa.

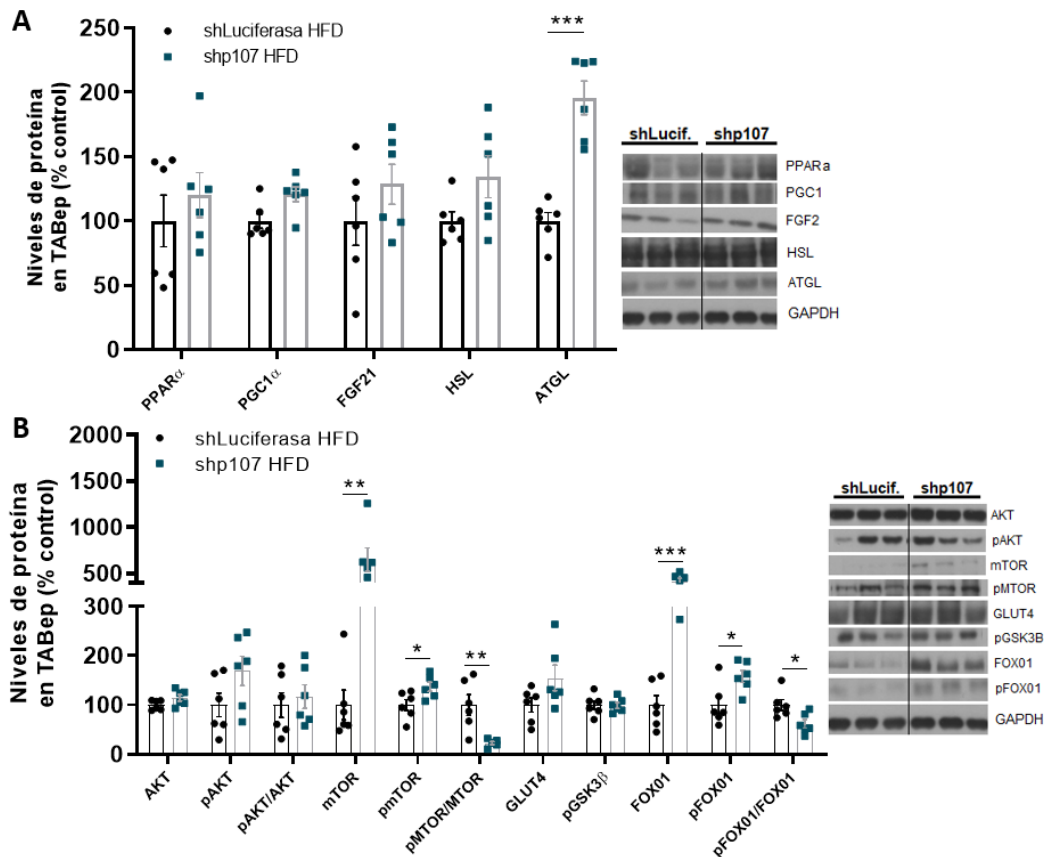


Figura 17. (A) Cuantificación e imágenes representativas obtenidas por western blot de marcadores lipolíticos como PPAR α , PGC1 α , FGF21, HSL y ATGL; (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, MTOR, pMTOR, GLUT4, pGSK3 β , FOX01 y pFOX01 en TABep de ratones shLuciferase (n = 6) y shp107 (n = 6) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, * p \leq 0.001 entre los ratones shLuciferase y shp107.**

Con los cambios significativos en la ruta del metabolismo de lípidos y de la glucosa en el tejido adiposo blanco epididimal de ratones en HFD, buscamos valorar los posibles efectos en el tejido adiposo blanco subcutáneo (TABsc). El tejido adiposo subcutáneo ha sido relacionado con el *browning* y con una mayor actividad metabólica. Por ello nos propusimos analizar los efectos en TABsc.

Primeramente, evaluamos el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo de los ratones shp107 y sus controles. Su análisis morfológico reveló una hipoplasia significativa de adipocitos en los ratones shp107 en comparación con los controles (Figura 18A). Es ampliamente reconocida la capacidad del TABsc pasar por el proceso de

amarronamiento. En este proceso, ocurre un incremento de la actividad termogénica en TABsc, provocando un cambio morfológico de los adipocitos.

A continuación, analizamos la expresión de las principales proteínas involucradas en la LDN. Se encontró un claro incremento de FAS, estadísticamente significativo y una tendencia en pACC. Sin embargo, no encontramos cambios en las otras proteínas estudiadas (Figura 18B).

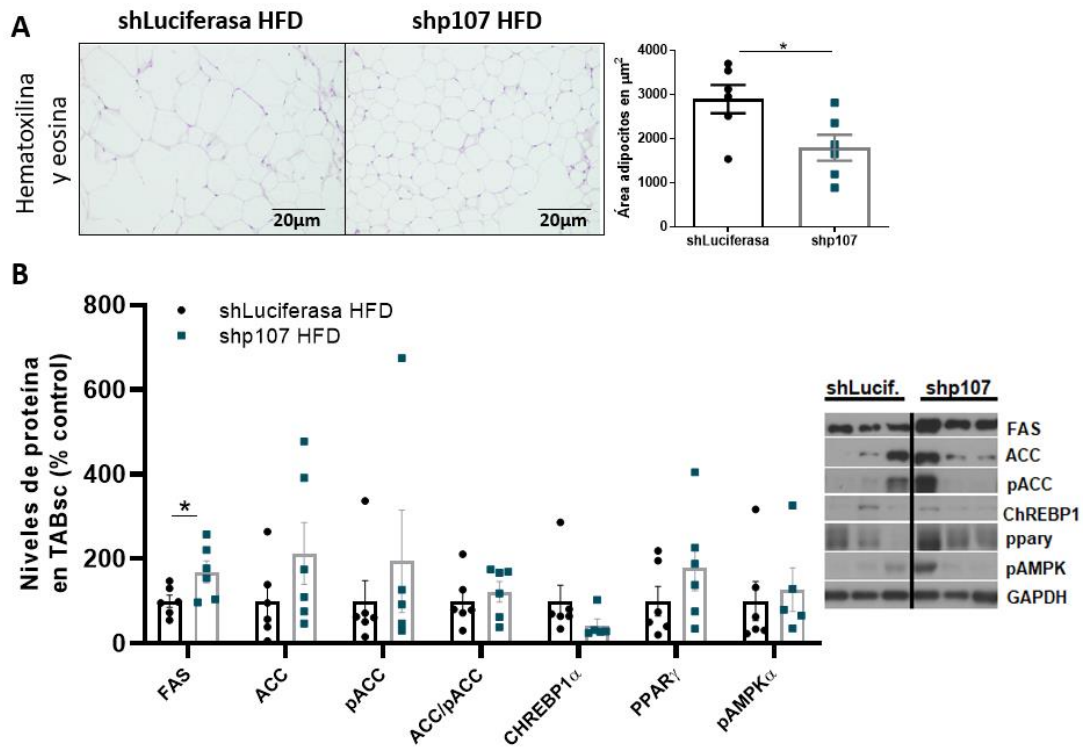


Figura 18. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina del adipocito subcutáneo y tamaño de los adipocitos (μm^2). **(B)** Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, PPAR γ y pAMPK α . Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

En cuanto a marcadores de lipólisis y β -oxidación no observamos cambios significativos (Figura 19A). Sin embargo, en los marcadores de *browning*, si bien vemos un claro incremento de FGF21 juntamente con PRDM16 en los ratones shp107 (Figura 19B), no se ve ningún cambio significativo en UCP1. Indicando que la ausencia de p107 en hígado tiene un efecto mas discreto en el amarronamiento del tejido adiposo blanco subcutáneo que el que observamos en el animal p107 KO global (Datos no mostrados, aparecen en la tesis de Juan Cuñarro).

Por otra parte, en relación a proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa, encontramos un incremento de los niveles de AKT, el ratio pAKT/AKT que indica que la activación de la vía disminuye (Figura 19C).

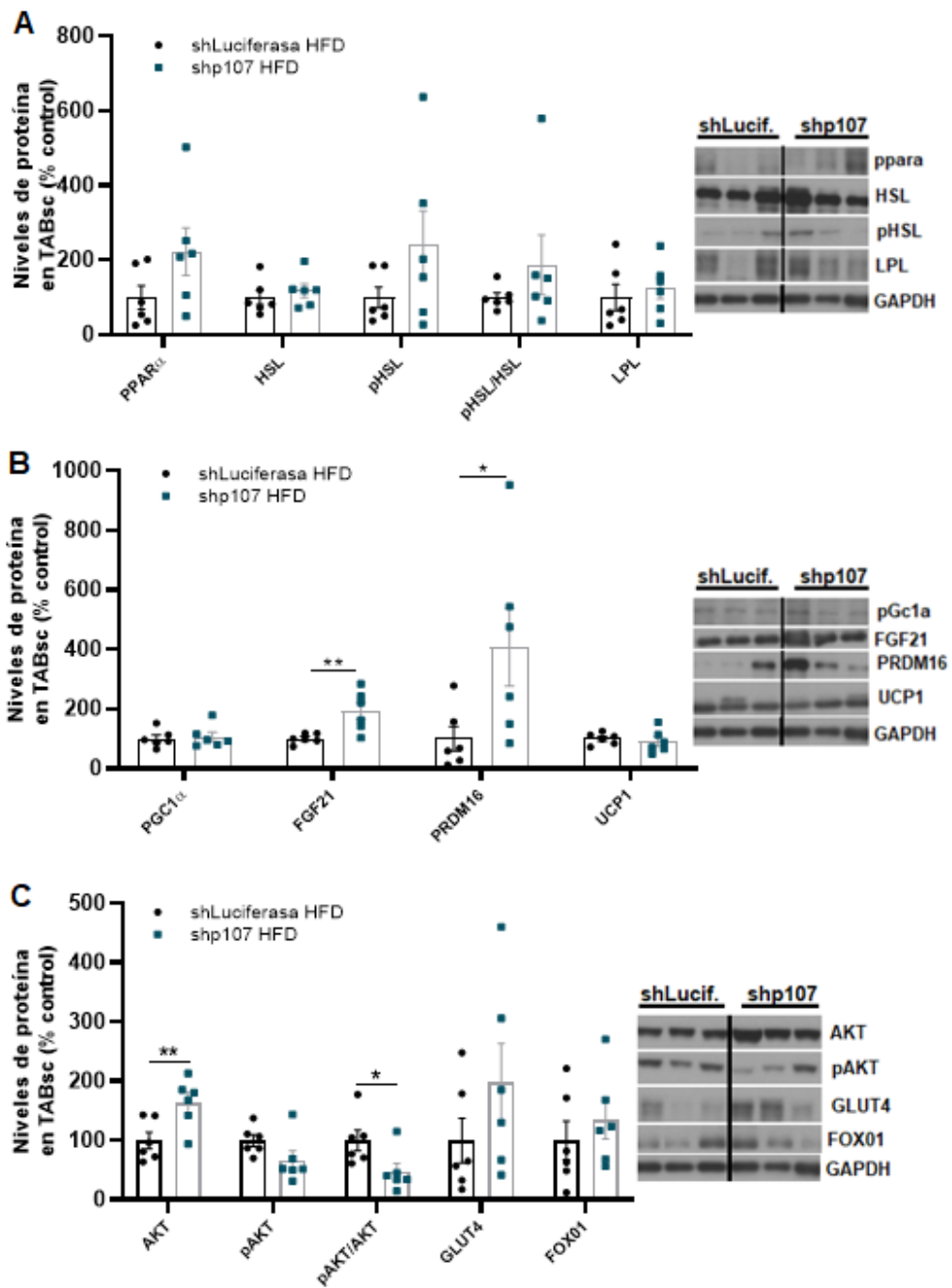


Figura 19. (A) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipolíticos como PPAR α , HSL, pHSL, LPL; y (B) marcadores de amarronamiento del tejido adiposo blanco subcutáneo como PGC1 α , FGF21, PRDM16 y UCP1; y (C) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, GLUT4 y FOXO1 en TABsc de ratones shLuciferasa (n = 6) y shp107 (n = 6) en HFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

3 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE P107 EN HÍGADO SOBRE EL TEJIDO ADIPOSITO BLANCO EN UN MODELO DE MASLD INDUCIDO POR CDHFD

Habiendo estudiado las acciones de p107 en el ratón KO global y sometido a dieta CD-HFD, nos propusimos averiguar cuales serían las consecuencias de inhibir la expresión de p107 únicamente en hígado en un estadio más avanzado de enfermedad hepática.

3.1 LA INHIBICIÓN DE P107 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CDHFD DEMUESTRA UNA MEJOR SENSIBILIDAD A LA INSULINA

Los ratones fueron sometidos a una dieta alta en grasa 45% sin colina por 14 semanas. La dieta CDHFD fue introducida a los ratones, tras 6 semanas de la administración del lentivirus. Se evaluó el nivel de inhibición de la expresión de p107 en los animales (Figura 20A).

Durante las 20 semanas de seguimiento de peso y composición corporal, hemos visto que la inhibición de p107 en hígado en los ratones tratados con CDHFD no produce diferencias destacadas en el incremento semanal de peso corporal en estos ratones (Figura 20B), tampoco alteró la composición corporal de los ratones shp107 comparados a los shLuciferasa (Figura 20C).

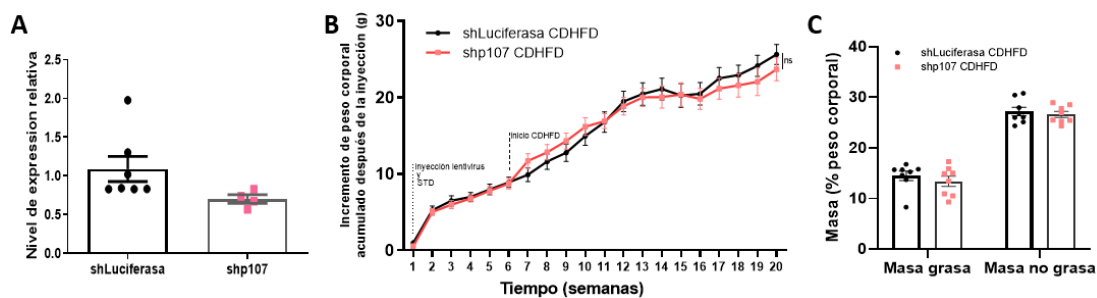


Figura 20. La inhibición específica de hígado de p107 no altera el peso corporal de ratones expuestos por 14 semanas con una CDHFD. (A) Nivel de expresión relativa de p107 en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 4). (B) Incremento de peso corporal durante 14 semanas con CDHFD, ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8). (C) Composición de masa grasa y no grasa en los ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8) al final del experimento

El siguiente paso fue comprobar si la inhibición de p107 en hígado es capaz de mejorar la homeostasis de la glucosa en una dieta CDHFD. No observamos cambios significativos en los niveles de glucosa en sangre de los animales alimentados *ad libitum* (Figura 21A). Tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de glucosa entre los ratones en ayuno (Figura 21B). En la GTT (Figura 21C), no encontramos diferencias entre los grupos. Sin embargo, en la prueba de tolerancia a la insulina, observamos una mejor respuesta a la administración de insulina con mayor disminución de los niveles de glucosa en el grupo shp107 comparado con los controles a los 30 y 60 minutos y en el AUC (Figura 21D). Con el objetivo de estimar la gluconeogénesis hepática, hicimos la prueba de tolerancia al piruvato. Sin embargo, salvo a los 15 minutos tras administración, no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos (Figura 21E).

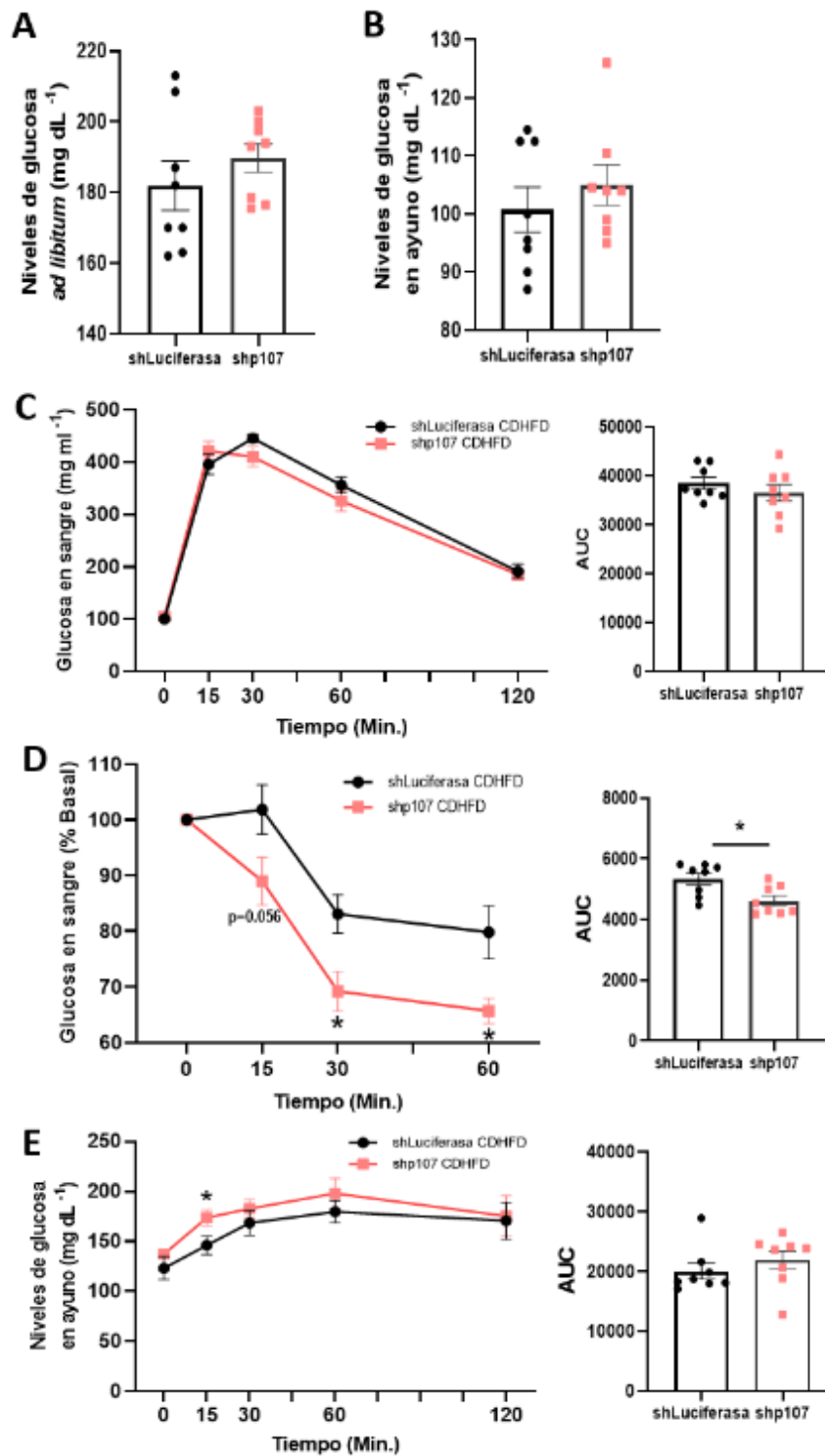


Figura 21. Los ratones con inhibición de p107 en hígado, tratados con CDHFD presentan una mejor sensibilidad a la insulina. (A) Concentración de glucosa en sangre de ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8) con 14 semanas en CDHFD. (B) Concentración de glucosa en sangre después de un ayuno de 12h en ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8). (C) Prueba de tolerancia a la glucosa y su área bajo la curva de ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8). (D) Prueba de tolerancia a la insulina y su área bajo la curva en ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8). (E) Prueba de tolerancia al piruvato y su área bajo la curva de ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8). Los

datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

Para evaluar los parámetros lipídicos de estos animales, se midió los niveles de triglicéridos y de colesterol en suero. El análisis de triglicéridos en suero no reveló cambios significativos a pesar de una sutil bajada vista en ratones inyectados con lentivirus shp107 (Figura 22A). Sin embargo, se observó una bajada significativa de los niveles circulantes de colesterol en estos animales (Figura 22B).

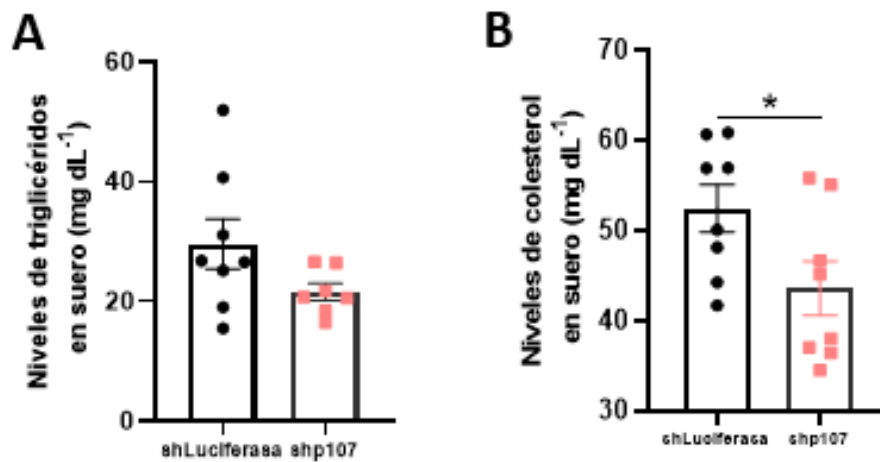


Figura 22. Los ratones con inhibición de p107 en hígado, tratados con CDHFD presentan bajos niveles circulantes de lípidos. (A) Niveles de TG en suero de ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8) con 14 semanas en CDHFD. (B) Niveles de colesterol en suero de ratones shLuciferasa (n = 8) y shp107 (n = 8) con 14 semanas en CDHFD. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

3.2 LA INHIBICIÓN DE P107 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CDHFD DISMINUYE EL ACÚMULO LIPÍDICO Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO

Los análisis histológicos y la cuantificación de la tinción Oil Red O, nos mostraron una menor acumulación de grasa en hígado en los ratones con inhibición de p107 hepática y alimentados con CDHFD (Figura 23A). Además, se observa una bajada en los niveles de triglicéridos hepáticos en los ratones shp107 (Figura 23B). Como la CDHFD puede llevar a comienzo de fibrosis hepática, esta condición también fue evaluada histológicamente a través del Sirius Red, sin embargo no se vieron cambios significativos en la acumulación de colágeno (Figura 23C), entre los ratones shp107 y los controles. Como sabemos que esta dieta promueve un acúmulo rápido e importante de grasa en el hígado, la inhibición de p107 puede no ser efectiva en este caso de fibrosis.

Profundizando en las vías moleculares, investigamos la expresión de diferentes proteínas clave en la lipogénesis *de novo*. De manera destacada, y como ya habíamos visto en estudios previos de nuestro grupo con ratones shp107 en HFD, la inhibición de p107 en el hígado produjo una disminución de las principales enzimas de la lipogénesis como son FAS y ACC y además en este caso SCD1 que también se encontraba disminuida (Figura 23D). A pesar de esto, el FT SREBP1 y ChREBP1 no presentaron cambios comparados a los controles shLuciferasa.

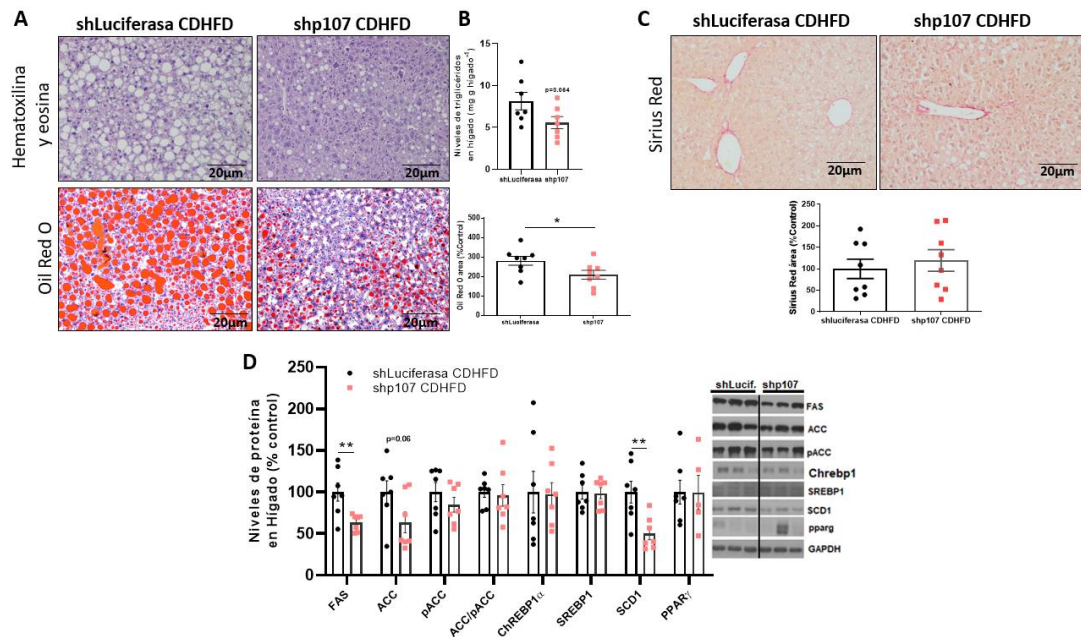


Figura 23. La inhibición específica de hígado de p107 protege contra la esteatosis inducida por CDHFD y mejora el metabolismo hepático de la glucosa. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina (panel superior) y tinción de Oil Red O (panel inferior) de secciones de hígado de ratones y cuantificación de la tinción Oil Red O, shLuciferasa (n = 8) y ratones shp107 (n = 8). (B) Niveles de triglicéridos hepáticos, shLuciferasa (n = 8) y ratones shp107 (n = 8). (C) Tinción representativa de Sirius Red de secciones de hígado de ratones y cuantificación de la tinción Sirius Red, shLuciferasa (n = 8) y ratones shp107 (n = 8). (D) Marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1, SCD1 y PPAR γ en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, entre los ratones shLuciferasa y shp107.

A continuación, evaluamos los marcadores de lipólisis en hígado. Solamente observamos un incremento de HSL en los ratones con inhibición específica de p107 en hígado (Figura 24A). Diferente de lo que se observa en HSL, los valores de ATGL parecen más bajos en los ratones shp107. PPAR α no presentó ningún tipo de cambio. Por último, evaluamos cambios en marcadores del metabolismo de glucosa. Al contrario de lo observado en los ratones shp107 en HFD, solamente FOXO1 presentó una disminución en el grupo shp107 (Figura 24B) cuando son alimentados con CDHFD.

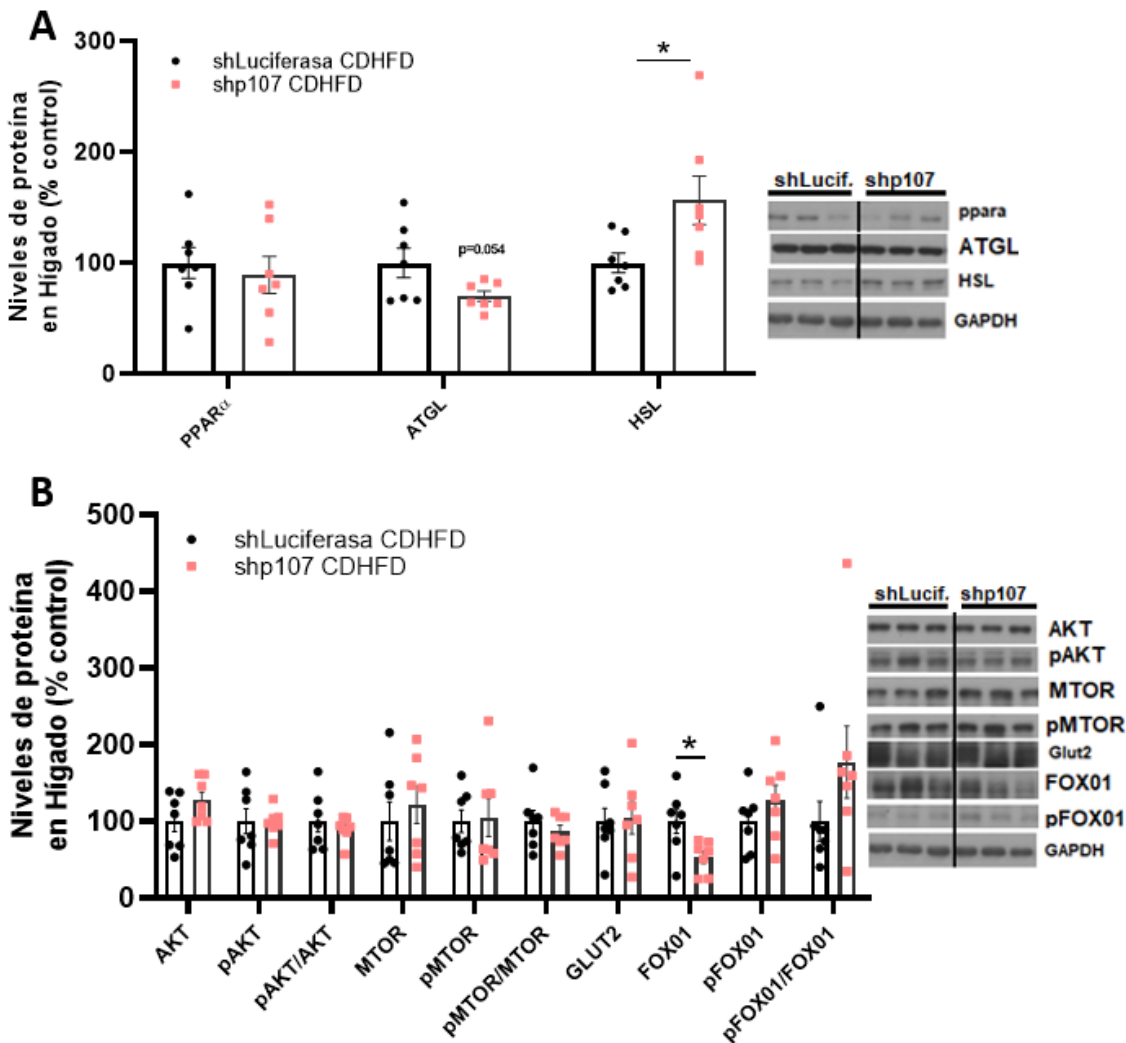


Figura 24. Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (A) marcadores lipolíticos como PPAR α , ATGL, HSL; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, mTOR, pMTOR, GLUT2, FOXO1 y pFOXO1 en hígado de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) en CDHFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

3.3 ACCIONES DE LA INHIBICIÓN DE p107 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CDHFD EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y GLUCOSA EN TABEP Y TABSC

El siguiente paso fue evaluar como la inhibición específica de p107 en hígado afectaría el TAB. Primeramente, y tras el análisis histológico medimos el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco epididimal de los ratones shp107 y sus controles. Sin embargo, no observamos diferencias significativas de tamaño (Figura 25A). A nivel molecular no encontramos cambios significativos en la expresión de los marcadores de LDN como FAS, CHRBP1 o SREBP1. Sin embargo, hubo un aumento estadísticamente significativo de la forma fosforilada de ACC (Figura 25B). Podemos ver claramente que mientras en el hígado había una disminución de los marcadores de lipogénesis de los shp107, en TABep notamos un aumento de estos marcadores. Esta respuesta antagónica sugiere fuertemente, que los animales con inhibición de p107 en hígado, presentan una actividad lipogénica aumentada en TABep que evita un posible desequilibrio con el tejido hepático, impidiendo la activación de la LDN en hígado, siendo más resistente al desarrollo de la esteatosis hepática.

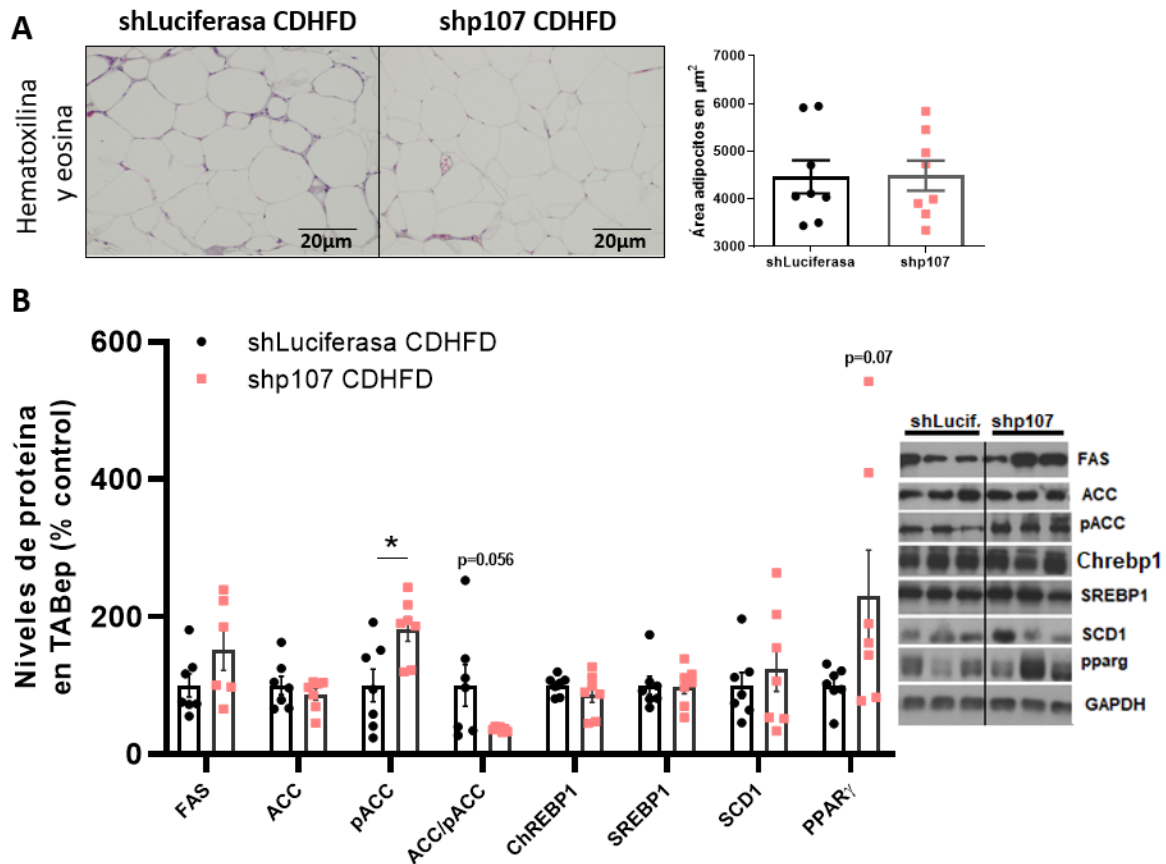


Figura 25. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina del tejido adiposo epididimal y tamaño de los adipocitos (μm^2). (B) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1, SCD1 y PPAR γ . Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

En cuanto a los marcadores lipolíticos, de nuevo no hay cambios significativos en los marcadores analizados ATGL y HSL, salvo un ligero aumento de PPAR α en los ratones con inhibición hepática de p107, aunque el valor no es significativo (Figura 26A). Por último, se observó un incremento de FOXO1 y GLUT4, en los ratones shp107 (Figura 26B). El incremento de FOXO1 puede indicar una diferenciación de los adipocitos y regular positivamente la expresión de GLUT4 y adiponectina. Sin embargo, de forma general podemos concluir con los resultados obtenidos la consistente y robusta actividad inversa del tejido adiposo blanco (TAB) en el metabolismo lipídico y de la glucosa comparada al tejido hepático de los ratones con la ausencia de p107 en hígado.

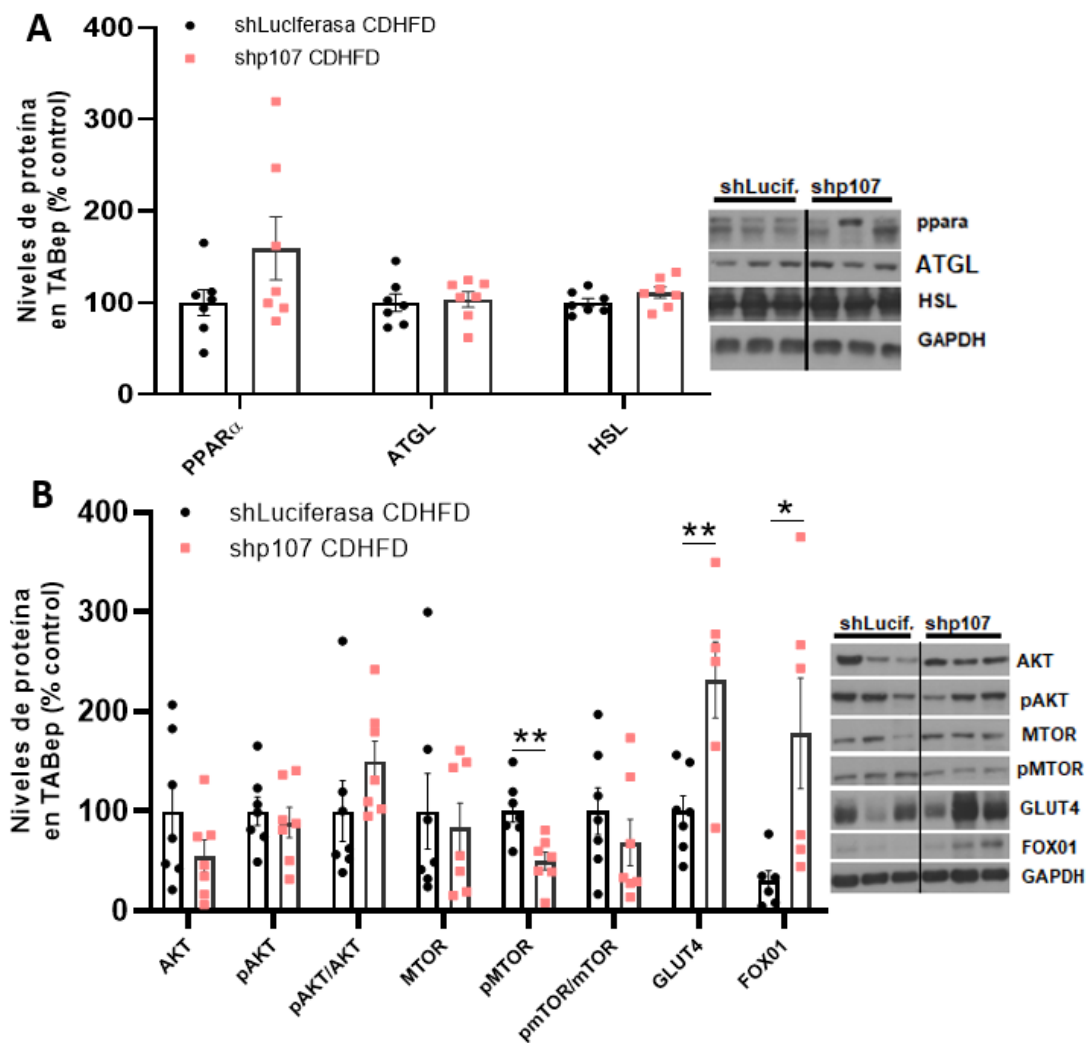


Figura 26. (A) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipolíticos como PPAR α , ATGL, HSL; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, mTOR, pMTOR, GLUT4, FOX01 en TABep de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) en CDHFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: * $p \leq 0.05$ **, $p \leq 0.01$ entre los ratones shLuciferasa y shp107.

De nuevo y dada la relevancia del *browning*, evaluamos el tejido adiposo blanco subcutáneo de los ratones shp107 y sus controles. Diferente de lo que se observó del TABsc de los animales HFD, los adipocitos de los shp107 CDHFD no presentan una disminución de su tamaño (Figura 27A). Por otro lado, en el estudio molecular no encontramos cambios en las enzimas de la LDN tras la inhibición de p107 en el hígado en un modelo de CDHFD (Figura 27B).

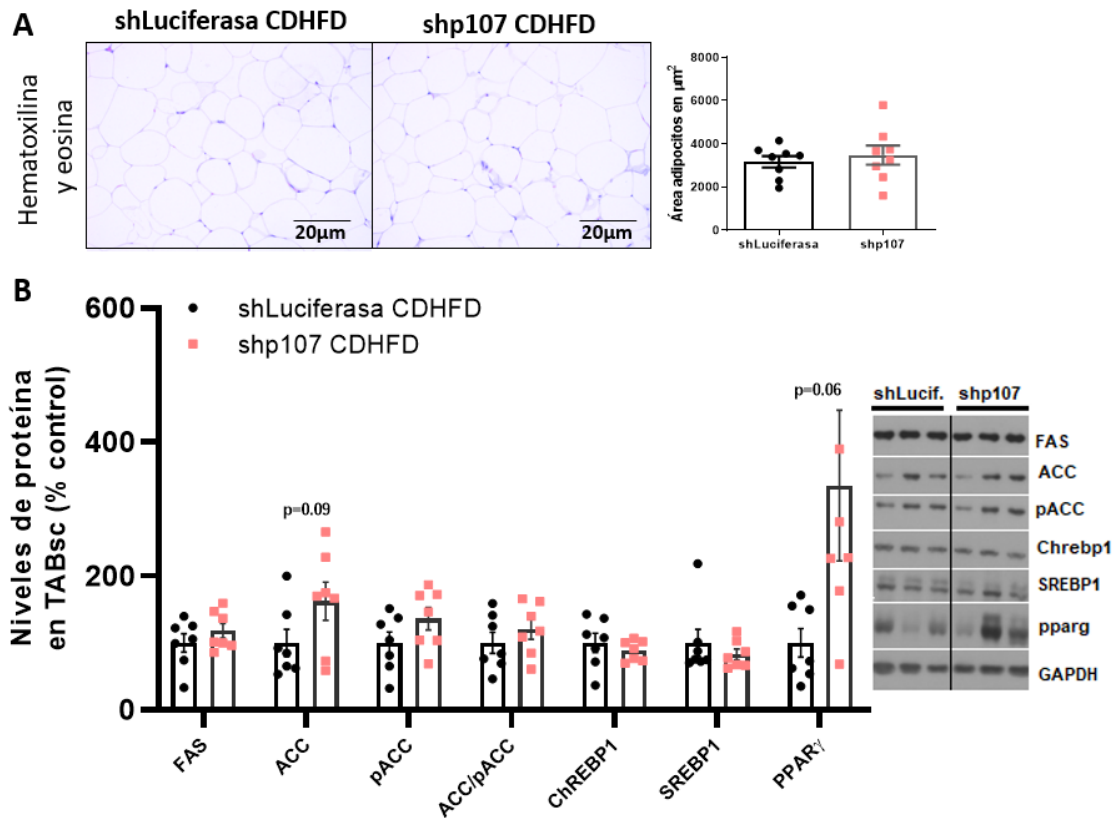


Figura 27. (A) Tinción representativa de hematoxilina y eosina del adipocito subcutáneo y tamaño de los adipocitos (μm^2). Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de (B) marcadores lipogénicos, como FAS, ACC, pACC, ChREBP1, SREBP1 y PPAR γ . Los datos se expresan como media \pm SEM.

Centrándonos en la oxidación de AGs y en la lipólisis, se midieron los niveles de expresión de proteínas implicadas en estos mecanismos. Encontramos un incremento de los niveles de PPAR α , PGC1 α y LPL, aunque no sean significativos (Figura 28A). Medimos también las proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa en TABsc. Interesantemente, los niveles de AKT y Glut4 están aumentados en este tejido, como observado en TABsc de los ratones shp107 alimentados con HFD (Figura 28B). Lo que demuestra un posible papel de protección contra la intolerancia a la glucosa, ejercido por TABsc para la manutención de la homeostasis sistémica de la glucosa.

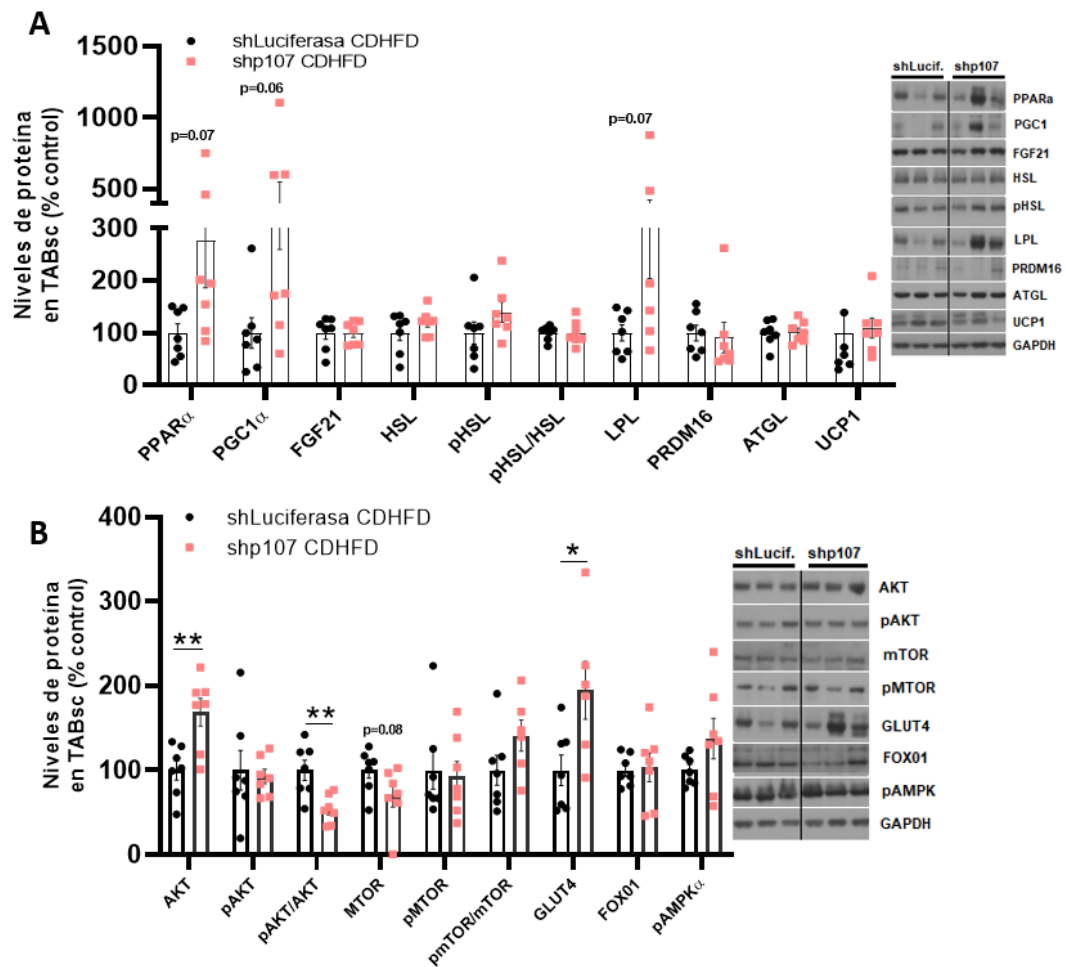


Figura 28. (A) Cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores lipolíticos como PPAR α , PGC1 α , FGF21, HSL, pHSL, LPL, PRDM16, ATGL y UCP1; y (B) marcadores de metabolismo de glucosa como AKT, pAKT, mTOR, pmTOR, GLUT4, FOXO1 y pAMPK α en TABsc de ratones shLuciferasa (n = 7) y shp107 (n = 7) en CDHFD y las imágenes representativas. Los datos se expresan como media \pm SEM. Tras aplicar el T-test: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 entre los ratones shLuciferasa y shp107.

DISCUSIÓN

En la actualidad, se encuentra ampliamente aceptada la relación de p107 (miembro de la familia de las PP) con el metabolismo energético. Como ha sido presentado anteriormente en este trabajo, p107 ejerce acciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, además de actuar en diferentes tejidos regulando la proliferación y diferenciación celular^{162,207,213}. A nivel sistémico, ha sido demostrado que la inhibición global de p107 promueve diferentes beneficios a ratones alimentados con una dieta alta en grasa HFD 60%. Estos animales muestran un mayor gasto energético debido a un incremento de la termogénesis, que está mediada principalmente por el tejido adiposo marrón (TAM) y el “amarronamiento” del tejido adiposo blanco (TAB). Además, se observa una resistencia a los efectos provocados por una dieta alta en grasa, lo que resulta en un fenotipo más delgado y una adiposidad reducida en comparación con los ratones controles. Otro dato importante, es la mejora del perfil lipídico y del metabolismo de la glucosa. El perfil lipídico de los ratones p107 KO presenta concentraciones reducidas de triglicéridos y colesterol circulantes y una menor deposición de lípidos en el hígado. Asimismo, estos ratones muestran un metabolismo de la glucosa mejorado y una mayor sensibilidad a la insulina, en particular cuando son expuestos a una HFD, lo que se evidencia por niveles más bajos de glucosa en sangre y una mejor respuesta a la insulina, lo que contribuye positivamente a la salud metabólica general²¹³.

Dada la relevancia de los efectos positivos en la prevención de la esteatosis hepática en los ratones p107 KO global, el presente estudio buscó investigar si los posibles cambios a nivel hepático venían acompañados en modificaciones del metabolismo del tejido adiposo.

Silenciamiento global de p107, homeostasis energética y metabólica.

En el primer momento de este estudio, nos propusimos investigar si la inhibición global de p107 afectaría los ratones alimentados con CDHFD, que lleva a un estadio más avanzado de la esteatosis hepática. Como observado anteriormente en los ratones p107 KO alimentados con HFD, estos animales son más resistentes a la ganancia de peso y presentan un fenotipo más delgado comparado a los controles WT. También observamos a nivel sistémico, que la delección global de p107 influye en la tolerancia a la glucosa, en la sensibilidad a la insulina y en los niveles de lípidos circulantes. Estos ratones son más tolerantes a la glucosa, responden mejor a la insulina y presentan niveles más bajos de triglicéridos y colesterol en suero. Además, a nivel histológico, encontramos cambios significativos tanto en los hepatocitos como en los adipocitos. Los ratones p107 KO presentaron una menor acumulación de grasa en los hepatocitos, como una disminución del tamaño de los adipocitos del tejido epididimal y subcutáneo.

A nivel molecular, intentamos investigar las vías de señalización alteradas por la ausencia de p107, tanto en el hígado como en el tejido adiposo blanco. Como estos animales presentan un fenotipo tan marcado, delgados y con bajo porcentaje de grasa, esperábamos cambios robustos en algunas de las posibles vías metabólicas implicadas. Dentro del tejido hepático, se observó una bajada significativa de la lipogénesis *de novo*. Por otra parte se evidencia una activación de la vía PI3K-AKT, un dato relevante ya que estos animales presentan una mejor respuesta a la insulina y son más tolerantes a la glucosa. En el tejido adiposo blanco, tanto epididimal como subcutáneo, podemos ver la activación de vías lipolíticas y de β -oxidación. Esta información es de gran importancia ya que apunta mecanismos capaces de redistribuir los lípidos circulantes para el TAB, evitando que lleguen al hígado. Sin embargo, es importante destacar que los animales p107 KO, son ratones que constitutivamente no expresan p107. De esta forma desde su nacimiento el organismo busca mecanismos compensatorios para que el animal prosiga su desarrollo fisiológico.

Con los datos obtenidos en el ratón p107 KO, quisimos averiguar la implicación de la ausencia de p107 específicamente en hígado sobre el metabolismo tanto del hígado como del tejido adiposo, dada la importancia de la intercomunicación entre ambos órganos.

Inhibición hepática de p107 tras HFD. Efectos hepáticos relacionados con homeostasis energética y metabólica.

Partiendo de los datos de los ratones KO alimentados con HFD y presentados en tesis anteriores del grupo, comenzamos estudiando los efectos específicos de la inhibición de p107 en hígado, en ratones alimentados con HFD 60% y evaluamos su impacto en el desarrollo de la esteatosis hepática e intolerancia a la glucosa en un modelo de ratón obeso. A nivel de homeostasis energética, no observamos cambios en el peso corporal de los ratones shp107. Este dato no es sorprendente dado que otros estudios, demuestran que una inhibición específica de determinadas proteínas en el hígado, no es capaz de alterar la ingesta de alimentos y el peso corporal de ratones²¹⁶. Tampoco notamos una mejora en la sensibilidad a la glucosa y a la insulina y en los niveles de lípidos circulantes. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los ratones shp107 presentan niveles fisiológicos de glucosa más bajos que sus controles shLuciferasa tanto en *ad libitum* como en ayuno. Cuando comparamos estos datos con los resultados observados con ratones p107 KO global²¹³, podemos pensar que la falta de cambios significativos en el fenotipo de los ratones shp107, está directamente relacionada a un efecto restringido a la inhibición parcial de p107 en hígado.

Por todo ello, para este trabajo utilizamos el modelo de vectores virales, para explorar los efectos fenotípicos restringidos al tejido hepático en dos modelos de hígado graso. El primer hallazgo relevante fue la disminución del acúmulo de grasa en tejido hepático de los ratones shp107. Nuestros resultados histomorfológicos muestran que la delección específica de p107 en hepatocitos provoca una disminución del acúmulo de grasa en el hígado. Además, a nivel molecular, evaluamos los distintos biomarcadores de activación de la LDN en el tejido hepático. Dentro de las principales proteínas reguladoras de la LDN hepática, observamos una bajada de la expresión de FAS, pACC, SCD1, SREBP1 y ChREBP1 en los ratones shp107 y coincidentes con el KO global, indicando las acciones directas de p107 sobre hígado y que no son dependientes de la ausencia de p107 en el tejido adiposo. Y que demuestran un efecto beneficioso contra la esteatosis hepática ya demostrado en otros estudios^{219,220}. Este hallazgo nos lleva a pensar en posibles fármacos o compuestos capaces de actuar sobre estas proteínas, inhibiendo su actividad y de esta forma resultando en una menor actividad de la LDN hepática. Actualmente, dado el papel fundamental de las enzimas ACC en la LDN, algunos ensayos clínicos están centrados en posibles inhibidores específicos de ACC como alternativas para reducir las tasas de LDN y de esta forma limitar el acúmulo de grasa en el hígado²²¹.

En cuanto a los efectos en el metabolismo de la glucosa, nuestros resultados obtenidos demuestran un incremento en la expresión de pMTOR, pPDH, GLUT2, GCK, PCK1. Como la resistencia a la insulina impulsa la LDN en la MASLD, una mejora en el metabolismo de la glucosa influye directamente en la resistencia al aumento de grasa hepática. La insulina actúa estimulando la actividad de la glucógeno sintasa, que ayuda a almacenar el exceso de glucosa como glucógeno, lo que reduce la cantidad de glucosa disponible para la conversión en grasa¹⁷⁶. Esos efectos podrían ser consecuencia del incremento observado de GLUT2 y GCK. Además, esta mejora en el metabolismo de glucosa, corrobora con los niveles de glucosa circulantes más bajos en los ratones shp107. Otro hallazgo interesante es el incremento de PCK1, esencial para el mantenimiento del metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa. Se ha visto que la pérdida de PCK1 activa la vía de señalización RhoA/PI3K/AKT, que conduce a una mayor

expresión de genes lipogénicos y síntesis de lípidos, lo que contribuye al desarrollo de la esteatosis y de fibrosis²²², con lo que un análisis de estas vías podría confirmar esas acciones.

Inhibición hepática de p107 tras HFD. Efectos en TABep relacionados con homeostasis energética y metabólica.

Para ello evaluamos el metabolismo de lípidos y de la glucosa en TAB epididimal de los ratones shp107 alimentados con HFD 60%. En condiciones fisiológicas, la lipogénesis *de novo* en el TAB ocurre principalmente después de la ingesta de alimentos, en particular cuando hay un exceso de carbohidratos. La glucosa irá convertirse en ácidos grasos cuando la ingesta de energía excede el gasto energético. Es importante destacar que el proceso es estimulado por la insulina, que promueve la captación de glucosa en los adipocitos, activa las proteínas de LDN y inhibe la lipólisis, lo que fomenta el almacenamiento del exceso de energía en forma de grasa^{175,223}. Sin embargo, en el contexto de la obesidad, la capacidad de realizar la LDN se ve afectada, este proceso está suprimido en el TAB, lo que está vinculado a la resistencia a la insulina. Como los animales de nuestro estudio fueron alimentados con una dieta alta en grasa por varias semanas, consecuentemente ellos aumentaron significativamente el peso y desarrollaron una resistencia a la insulina, observada en la ITT. Este es otro factor que nos lleva a creer en el papel de la inhibición de p107 en el metabolismo lipídico en TAB. El primer resultado nos llamó especialmente la atención, debido al claro aumento de todas proteínas clave de la LDN como son FAS, ACC, ChREBP1, SREBP1 y SCD1 en el TAB de estos ratones comparado al grupo control. Al analizar las proteínas relacionadas con la lipólisis, sin embargo, no observamos ningún cambio significativo en las principales proteínas, solamente se observa un incremento de ATGL.

Otros datos a destacar, es el incremento de MTOR, pMTOR, FOXO1, pFOXO1 y una tendencia de aumento de pAKT y GLUT4. Es importante recordar que MTOR se integra a dos complejos, mTORC1 y mTORC2. mTORC es crucial para el crecimiento celular y los procesos anabólicos en los adipocitos blancos. La ausencia de mTORC1 en los adipocitos puede generar problemas metabólicos sistémicos, como resistencia a la insulina y esteatosis hepática, que son similares a los trastornos de lipodistrofia humana^{224,225}. Además, mTORC1 influye en las vías de señalización de la insulina. La vía PI3K/AKT es vital para las funciones metabólicas del tejido adiposo blanco, ya que influye en el almacenamiento de energía, la adipogénesis y la comunicación con otros tejidos metabólicos²²⁶. Por ejemplo, la pérdida de mTORC1 puede afectar la señalización de AKT, que consecuentemente afectará al mantenimiento del tejido adiposo. Otra proteína que demostró un incremento significativo en los ratones shp107, es FOXO1. FOXO1 se expresa en gran medida en el tejido adiposo visceral y es crucial para el almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos blancos, en la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros y en la movilización de energía en respuesta al estado nutricional^{227,228}. La tendencia de incremento de GLUT4, es un factor importante, dado que GLUT4 es un transportador de glucosa clave que media la captación de glucosa estimulada por insulina en los adipocitos blancos²²³. Dentro de las proteínas descritas anteriormente, vale destacar la interacción entre GLUT4 y PPAR γ , muy significativa en el contexto de la obesidad. Está descrito que la actividad reducida de GLUT4 puede conducir a un aumento de los ácidos grasos libres en circulación, lo que, combinado con la lipogénesis mediada por PPAR γ , exacerba la deposición de grasa hepática y la esteatosis¹⁶³.

Para seguir ahondando en el efecto de la inhibición de p107 en hígado sobre la esteatosis hepática, exploramos que ocurría con el TABsc. Este tejido es caracterizado por la capacidad de regular la temperatura corporal convirtiendo los adipocitos blancos en marrones, proceso conocido como amarronamiento. Como ya descrito en la bibliografía, el TABsc como el TABep es crucial para regular el equilibrio energético de todo el cuerpo, lo cual es esencial para prevenir trastornos metabólicos como la MASLD²²⁸. Estudios recientes demuestran que la disfunción de TABsc, más específicamente la capacidad adipogénica de TABsc, puede conducir a un acúmulo de grasa ectópica en el hígado²²⁹. Sin embargo, se ha visto también que individuos con MASLD presentan una hipertrofia de los adipocitos del TABsc^{230,231}. Por lo tanto TABsc ayuda a controlar el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, lo que influye en la salud del hígado²³². Sin embargo, el TABep y TABsc poseen diferentes funciones y características como, liberación de ácidos grasos, sensibilidad a la insulina, producción de diferentes adipocinas y papel en la homeostasis energética sistémica^{232,233}. Interesantemente, en este trabajo vemos una disminución del tamaño de los adipocitos de TABsc de los ratones shp107 comparados a los controles sin embargo, no presentó grandes cambios en la expresión de las proteínas involucradas con la lipogénesis *de novo* (LDN). Se ve solamente un incremento de FAS. Por otro lado, podemos observar un incremento de FGF21 y PRDM16, dos importantes proteínas de función directa en la lipólisis, sensibilidad a la insulina y amarronamiento de TAB. Aunque observamos un proceso opuesto en los adipocitos de TABep, estas alteraciones encontradas en TABsc tienen un beneficio potencial para el metabolismo energético. La disminución del tamaño de los adipocitos blancos ocurre típicamente durante la pérdida de peso o durante la restricción calórica, donde hay una movilización de la grasa almacenada para obtención de energía. Este proceso es facilitado principalmente por la lipólisis, que promueve la descomposición de los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos, que luego se liberan en el torrente sanguíneo para uso energético^{234,235}. Algunos estudios recientes demuestran un importante papel de FGF21 y PRDM16 en la lipólisis del TABsc^{236,237}. En el tejido adiposo blanco subcutáneo, FGF21 desempeña un papel en la mejora de la sensibilidad a la insulina y la reducción de la esteatosis hepática. FGF21 activa las vías de señalización descendentes, como la señalización de la MAP quinasa, crucial para procesos como la captación de glucosa²³⁸. En paralelo, PRDM16 mejora la oxidación de ácidos grasos en los adipocitos, lo que es necesario para estimular la diferenciación de adipocitos beige y suprimir la fibrogénesis. Se ha visto que en animales jóvenes, la pérdida de PRDM16 imita los efectos del envejecimiento, promoviendo la fibrosis e inhibiendo la formación de grasa beige. Algunas publicaciones describen un importante papel tanto de FGF21 como PRDM16 en el proceso de amarronamiento de TABsc^{232,239}. Sin embargo, referente a este tema, no podemos confirmar que haya un proceso de amarronamiento del TABsc en los ratones shp107, ya que no vimos un aumento de la expresión de UCP1 y PGC1 α , proteínas esenciales para la biogénesis mitocondrial y involucradas en el oscurecimiento del TAB²³⁹.

Estos primeros hallazgos de nuestro trabajo, demuestran que la inhibición de p107 en hígado es capaz de modular la comunicación de este tejido con el tejido adiposo blanco epididimal y subcutáneo. De esta manera, la inhibición específica de p107 parece promover cambios en la actividad del tejido adiposo blanco epididimal y subcutáneo de manera diferente. Por ello, la alteración de la actividad de TABep y TABsc se asocia a la disminución del acúmulo de grasa en hígado, mejorando el metabolismo de la glucosa y de los lípidos.



Inhibición hepática de p107 tras CDHFD. Efectos hepáticos y en TAB relacionados con homeostasis energética y metabólica.

La investigación preclínica de MASLD se realiza principalmente en roedores, sin embargo, aún no se ha encontrado el modelo ideal que recapitule la enfermedad humana. De todos modos, está ampliamente aceptado el uso de modelos inducidos por dieta como HFD y CDHFD. En cuanto al modelo de ratones con obesidad inducida por la dieta (HFD 60%), sabemos que la obesidad provoca diferentes eventos a nivel sistémico que finalmente terminan en el desarrollo de esteatosis hepática e incluso estadios más avanzados de MASLD. El modelo CDHFD (dieta rica en grasas y deficiente en colina) se caracteriza por conducir rápidamente al desarrollo de una hepatitis esteatótica asociada al metabolismo con fibrosis significativa, a menudo en un plazo de 12 semanas o menos. Esta rápida progresión lo convierte en un candidato sólido para estudiar MASLD. Mencionada anteriormente, el modelo HFD (dieta alta en grasas), por el contrario es eficaz para simular los aspectos metabólicos de la MASLD, generalmente da como resultado un fenotipo histológico más leve. Es decir, puede modelar algunas características metabólicas, sin embargo no captura por completo la gravedad del daño hepático observado en la MASLD humana. No obstante, es importante destacar que el modelo CDHFD parece ser más adecuado para estudiar la progresión fibrótica de MASLD en comparación con el modelo HFD, que puede no reflejar adecuadamente la gravedad histológica

240

Por ello en este trabajo quisimos simular un estadio más avanzado de la enfermedad hepática por lo que alimentamos a los ratones con una dieta CDHFD. Inicialmente analizamos cambios fenotípicos y los efectos sistémicos de la inhibición de p107 en el hígado. Durante todo el período de acceso a la dieta CDHFD, los animales no presentaron cambios en el peso corporal, tampoco en la masa grasa y masa no grasa. Sin embargo, diferente de lo que observamos en el modelo de HFD 60%, los ratones shp107 alimentados con esta dieta presentaron una mayor sensibilidad a la insulina y una menor concentración de lípidos circulantes en los ratones shp107 comparados a los controles. En los análisis histológicos de hígado, observamos la disminución en el acúmulo de grasa en el tejido hepático. Y a nivel molecular y en consonancia con lo que encontramos en el modelo anterior, los ratones shp107 alimentados con CDHFD, también presentan una disminución de proteínas involucradas en la LDN, como FAS, ACC y SCD1. De esta forma, podemos confirmar que incluso en un modelo más agresivo en el acúmulo de grasa, debido a la deficiencia en colina, la inhibición de p107 en hígado es capaz de proteger este tejido contra la esteatosis. Por otra parte, no observamos una mejora en la fibrosis generada por esta dieta. Los ratones shp107 presentan niveles de fibrosis similar a sus controles.

Sin embargo, en este caso los cambios producidos sobre el tejido adiposo son más discretos con un incremento de pACC y PPAR γ en los ratones shp107 sobre el tejido adiposo epididimal y un incremento de FOXO1 y GLUT4. Este aumento es bastante similar a lo que observamos de la expresión de estos dos marcadores en los ratones shp107 en HFD. Solamente la expresión de pMTOR se contrasta a lo que observamos anteriormente en los ratones alimentados con HFD. En este caso, los valores de pMTOR están más bajos en los ratones shp107 alimentados con CDHFD. En cuanto al tejido adiposo subcutáneo, no pudimos ver ningún cambio significativo. Cuando comparamos estos resultados con lo que encontramos en ratones con HFD 60%, notamos que cuando sometidos a una CDHFD 45%, se observa solamente cambios sutiles en la lipogénesis y en la lipólisis. Nada considerable como vimos en los ratones alimentados con HFD 60%. El único dato que nos llama la atención es el incremento en AKT y GLUT4. Este incremento fue similar al observado en los animales alimentados con HFD.

En conjunto, en la presente tesis se propone un nuevo rol de p107 hepático en la comunicación del hígado con el tejido adiposo blanco, afectando el metabolismo lipídico y de la glucosa en el hígado. Hemos observado que principalmente en los ratones alimentados con HFD, la inhibición específica de p107 en hígado genera un beneficio específicamente en la resistencia al desarrollo de la enfermedad hepática crónica. Como se representa en la Imagen 9, la inhibición de p107 en hígado genera un mecanismo que en conjunto con el tejido adiposo blanco epididimal y subcutáneo, evita el acúmulo de grasa en hígado y además mejora el metabolismo de la glucosa y de lípidos tanto en el hígado como en el tejido adiposo blanco. A nivel hepático, se ve una disminución de la LDN que está directamente relacionada al acúmulo de grasa en el hígado y una mejora del metabolismo de la glucosa con el aumento de la expresión de proteínas claves en este proceso como, GLUT2, PCK1, GCK y mTOR. Curiosamente, por otro lado en el TABep podemos observar un incremento de la LDN. Además, notamos una mayor actividad de proteínas como FOXO1, mTOR, AKT, PPAR γ y GLUT4. Un dato bastante relevante dado que estas proteínas mejoran el metabolismo lipídico dentro del TABep. Ya en el TABsc, los cambios parecen más sutiles, sin embargo, siguen siendo importantes, ya que FGF21 y PRDM16 son esenciales para mejorar la sensibilidad a la insulina y para la oxidación de AGs, respectivamente. Los mecanismos implicados en esta comunicación como hepatoquinas u otros metabolitos tienen que ser determinados en trabajos futuros. Sin embargo, con estos resultados p107 se puede proponer como objeto de estudio y como potencial diana terapéutica frente a MASLD.

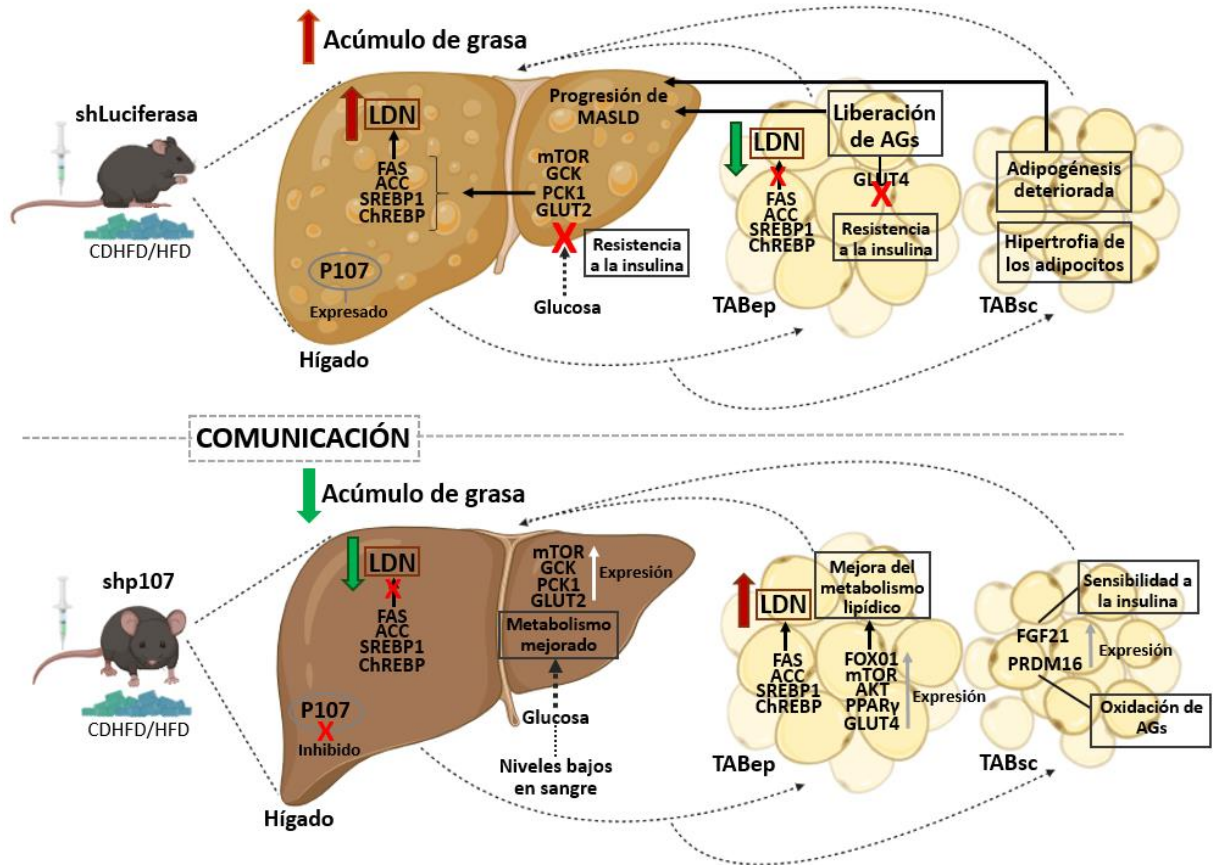


Imagen 9. Esquema resumen de los principales hallazgos de este estudio (elaboración propia, mediante Biorender).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- Ratones p107KO cuando alimentados con CDHFD 45%, presentan un fenotipo más delgado, mejor tolerancia a la glucosa, mejor sensibilidad a la insulina y disminución del acúmulo de grasa hepática.
- La inhibición de p107 en hígado promueve la disminución del acúmulo de grasa en el hígado de animales alimentados tanto con HFD 60% como CDHFD 45%.
- El silenciamiento de p107 hepático en ratones no afecta la fibrosis inducida por CDHFD 45%.
- El silenciamiento de p107 hepático tanto en animales alimentados con HFD como con CDHFD, disminuye la LDN en hígado y la incrementa en el TABep lo que conlleva mejora de la homeostasis metabólica.
- La expresión hepática y en TAB de p107 juega un papel esencial para defender la homeostasis tras exposición a dietas agresoras sobre el funcionamiento del hígado y TAB.
- En su conjunto, estos datos nos permiten postular a p107 como potencial diana terapéutica en MASLD.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Salerian, A. J. Thermodynamic laws apply to brain function. *Med. Hypotheses* **74**, 270–274 (2010).
2. Geary, N. Energy homeostasis from Lavoisier to control theory. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **378**, 20220201 (2023).
3. Lam, Y. Y. & Ravussin, E. Analysis of energy metabolism in humans: A review of methodologies. *Mol. Metab.* **5**, 1057–1071 (2016).
4. Hirota, K. & Fukamizu, A. Transcriptional regulation of energy metabolism in the liver. *J. Recept. Signal Transduct.* **30**, 403–409 (2010).
5. Hulbert, A. J. & Else, P. L. Basal metabolic rate: history, composition, regulation, and usefulness. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 869–876 (2004).
6. Mullur, R., Liu, Y.-Y. & Brent, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382 (2014).
7. Ratheiser, K. M., Brillon, D. J., Campbell, R. G. & Matthews, D. E. Epinephrine produces a prolonged elevation in metabolic rate in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1046–1052 (1998).
8. Haase, C. G., Long, A. K. & Gillooly, J. F. Energetics of stress: linking plasma cortisol levels to metabolic rate in mammals. *Biol. Lett.* **12**, 20150867 (2016).
9. Damjanovic, S. S. *et al.* Relationship between basal metabolic rate and cortisol secretion throughout pregnancy. *Endocrine* **35**, 262–268 (2009).
10. Westerterp, K. R. Exercise, energy balance and body composition. *Eur. J. Clin. Nutr.* **72**, 1246–1250 (2018).
11. Sjödin, A. M. *et al.* The influence of physical activity on BMR. *Med. Sci. Sports Exerc.* **28**, 85–91 (1996).
12. Chouchani, E. T., Kazak, L. & Spiegelman, B. M. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* **29**, 27–37 (2019).
13. Cypess AM, K. C. The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis. *Curr Opin Pediatr.* **22**, 478–484 (2010).
14. Rosen ED, S. B. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847–853 (2006).
15. Ye, J. & Medzhitov, R. Control strategies in systemic metabolism. *Nat. Metab.* **1**, 947–957 (2019).
16. Galgani J., R. E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int. J. Obes.* **32**, S109–S119 (2008).
17. Powley, T. L. & Keessey, R. E. Body energy homeostasis. *Appetite* **51**, 442–445 (2008).
18. Berthoud, H. R. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)*. **14 Suppl 5**, (2006).
19. Gastelum, C. *et al.* Adaptive Changes in the Central Control of Energy Homeostasis Occur in Response to Variations in Energy Status. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
20. Sharabi, K., Tavares, C. D. J. & Puigserver, P. Regulation of Hepatic Metabolism, Recent Advances, and Future Perspectives. *Curr. Diab. Rep.* **19**, 98 (2019).
21. Ramachandran, P., Matchett, K. P., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J. R. & Henderson, N. C. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 457–472 (2020).
22. Brubaker, P. L. & Martchenko, A. Metabolic Homeostasis: It's All in the Timing. *Endocrinology* **163**, (2022).
23. Nguyen, P. *et al.* Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **92**, 272–283 (2008).
24. Hodson, L., Rosqvist, F. & Parry, S. A. The influence of dietary fatty acids on liver fat content and metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **79**, 30–41 (2020).
25. Hussain, M. M. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 200–206 (2014).

26. Lo, C. C. & Coschigano, K. T. ApoB48 as an Efficient Regulator of Intestinal Lipid Transport. *Front. Physiol.* **11**, 796 (2020).
27. Tso, P. & Balint, J. A. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am. J. Physiol.* **250**, G715-26 (1986).
28. Zou, P. & Wang, L. Dietary pattern and hepatic lipid metabolism. *Liver Res.* **7**, 275–284 (2023).
29. Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. & Sul, H. S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 79–101 (2007).
30. Han, M. *et al.* Hepatocyte caveolin-1 modulates metabolic gene profiles and functions in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Death Dis.* **11**, 104 (2020).
31. Perez, V. M. *et al.* Deletion of fatty acid transport protein 2 (FATP2) in the mouse liver changes the metabolic landscape by increasing the expression of PPAR α -regulated genes. *J. Biol. Chem.* **295**, 5737–5750 (2020).
32. Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. & Abumrad, N. A. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 281–303 (2014).
33. Wilson, C. G. *et al.* Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology* **157**, 570–585 (2016).
34. Fisher, R. M., Miles, J. M., Kottke, B. A., Frayn, K. N. & Coppack, S. W. Very-low-density lipoprotein subfraction composition and metabolism by adipose tissue. *Metabolism.* **46**, 605–610 (1997).
35. Kovrov, O., Landfors, F., Saar-Kovrov, V., Näslund, U. & Olivecrona, G. Lipoprotein size is a main determinant for the rate of hydrolysis by exogenous LPL in human plasma. *J. Lipid Res.* **63**, 100144 (2022).
36. Chiu, S., Mulligan, K. & Schwarz, J.-M. Dietary carbohydrates and fatty liver disease: de novo lipogenesis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **21**, 277–282 (2018).
37. Sanders, F. W. B. & Griffin, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **91**, 452–468 (2016).
38. Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. & Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* **63**, 895–902 (2014).
39. Wallace, M. & Metallo, C. M. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Semin. Cell Dev. Biol.* **108**, 65–71 (2020).
40. Lamming, D. W. & Sabatini, D. M. A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab.* **18**, 465–469 (2013).
41. Laplante, M. & Sabatini, D. M. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.* **19**, R1046-52 (2009).
42. Soliman, G. A. The integral role of mTOR in lipid metabolism. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**, 861–862 (2011).
43. Iizuka, K., Takao, K. & Yabe, D. ChREBP-Mediated Regulation of Lipid Metabolism: Involvement of the Gut Microbiota, Liver, and Adipose Tissue. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 1–10 (2020).
44. Hodson, L. Hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of metabolic and nutritional state. *The Proceedings of the Nutrition Society* **78**, 126–134 (2019).
45. Aljohani, A. *et al.* Hepatic stearoyl CoA desaturase 1 deficiency increases glucose uptake in adipose tissue partially through the PGC-1 α -FGF21 axis in mice. *J. Biol. Chem.* **294**, 19475–19485 (2019).
46. Selen, E. S., Choi, J. & Wolfgang, M. J. Discordant hepatic fatty acid oxidation and triglyceride hydrolysis leads to liver disease. *JCI insight* **6**, (2021).
47. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid

- accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3313–3327 (2018).
48. Hashimoto, T. Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochem. Res.* **24**, 551–563 (1999).
 49. Jump, D. B., Tripathy, S. & Depner, C. M. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **33**, 249–269 (2013).
 50. Wierzbicki, A. S. & Oben, J. Nonalcoholic fatty liver disease and lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**, 345–352 (2012).
 51. Han, H.-S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H. & Koo, S.-H. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med.* **48**, e218 (2016).
 52. Adeva-Andany, M. M., Pérez-Felpe, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C. & Pazos-García, C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci. Rep.* **36**, (2016).
 53. Rui, L. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* **4**, 177–197 (2014).
 54. Roden, M. & Bernroider, E. Hepatic glucose metabolism in humans--its role in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **17**, 365–383 (2003).
 55. Bechmann, L. P. *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* **56**, 952–964 (2012).
 56. Pirola, C. J. *et al.* A Rare Nonsense Mutation in the Glucokinase Regulator Gene Is Associated With a Rapidly Progressive Clinical Form of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol. Commun.* **2**, 1030–1036 (2018).
 57. Zain, S. M., Mohamed, Z. & Mohamed, R. Common variant in the glucokinase regulatory gene rs780094 and risk of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **30**, 21–27 (2015).
 58. Wang, L., Li, J. & Di, L.-J. Glycogen synthesis and beyond, a comprehensive review of GSK3 as a key regulator of metabolic pathways and a therapeutic target for treating metabolic diseases. *Med. Res. Rev.* **42**, 946–982 (2022).
 59. Zhang, X., Yang, S., Chen, J. & Su, Z. Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 802 (2018).
 60. Chung, S. T., Chacko, S. K., Sunehag, A. L. & Haymond, M. W. Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review. *Diabetes* **64**, 3996–4010 (2015).
 61. Nuttall, F. Q., Ngo, A. & Gannon, M. C. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **24**, 438–458 (2008).
 62. Radziuk, J. & Pye, S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **17**, 250–272 (2001).
 63. Rajas, F., Gautier-Stein, A. & Mithieux, G. Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism. *Metabolites* **9**, (2019).
 64. Qu, H. *et al.* Glycolysis in Chronic Liver Diseases: Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Cells* **12**, (2023).
 65. Li, S., Hao, L. & Hu, X. Natural products target glycolysis in liver disease. *Front. Pharmacol.* **14**, 1242955 (2023).
 66. Lu, Q. *et al.* Metabolic Changes of Hepatocytes in NAFLD. *Front. Physiol.* **12**, 710420 (2021).
 67. Kang, W., Suzuki, M., Saito, T. & Miyado, K. Emerging Role of TCA Cycle-Related Enzymes in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 68. Akram, M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem. Biophys.* **68**, 475–478 (2014).
 69. Chen, L. *et al.* PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Quality Control: Molecular Mechanisms and Implications for Heart Failure. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 871357 (2022).
 70. Lin, X. & Li, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **12**, 706978 (2021).
 71. Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y sobrepeso. Available at:

- <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. (Accessed: 23rd May 2024)
72. Jackson, S. E., Llewellyn, C. H. & Smith, L. The obesity epidemic - Nature via nurture: A narrative review of high-income countries. *SAGE open Med.* **8**, 2050312120918265 (2020).
 73. Apovian, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am. J. Manag. Care* **22**, s176-85 (2016).
 74. Payab, M. *et al.* Metabolomics prospect of obesity and metabolic syndrome; a systematic review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **21**, 889–917 (2022).
 75. Hendricks, E. J. Off-label drugs for weight management. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **10**, 223–234 (2017).
 76. Pereira, R. M. *et al.* Short-term strength training reduces gluconeogenesis and NAFLD in obese mice. *J. Endocrinol.* **241**, 59–70 (2019).
 77. Lusis, A. J., Attie, A. D. & Reue, K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 819–830 (2008).
 78. National Institutes of Health (NIH). Metabolic Syndrome. Available at: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/metabolic-syndrome>. (Accessed: 25th May 2024)
 79. Habibullah, M. *et al.* Metabolic-associated fatty liver disease: a selective review of pathogenesis, diagnostic approaches, and therapeutic strategies. *Front. Med.* **11**, 1291501 (2024).
 80. Sangro, P., de la Torre Aláez, M., Sangro, B. & D’Avola, D. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): an update of the recent advances in pharmacological treatment. *J. Physiol. Biochem.* **79**, 869–879 (2023).
 81. Kaya, E. & Yilmaz, Y. Metabolic-associated Fatty Liver Disease (MAFLD): A Multi-systemic Disease Beyond the Liver. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **10**, 329–338 (2022).
 82. Kuchay, M. S., Choudhary, N. S. & Mishra, S. K. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. *Diabetes Metab. Syndr.* **14**, 1875–1887 (2020).
 83. Jeeyavudeen, M. S., Khan, S. K. A., Fouda, S. & Pappachan, J. M. Management of metabolic-associated fatty liver disease: The diabetology perspective. *World J. Gastroenterol.* **29**, 126–143 (2023).
 84. Chitturi, S. & Farrell, G. C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* **21**, 27–41 (2001).
 85. Tilg, H., Adolph, T. E. & Moschen, A. R. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology* **73**, 833–842 (2021).
 86. Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* **65**, 1038–1048 (2016).
 87. Huby, T. & Gautier, E. L. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 429–443 (2022).
 88. Idilman, I. S. *et al.* Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy. *Radiology* **267**, 767–775 (2013).
 89. Dong, Q. *et al.* Liver fibrosis and MAFLD: the exploration of multi-drug combination therapy strategies. *Frontiers in Medicine* **10**, (2023).
 90. Suvarna, R., Shetty, S. & Pappachan, J. M. Efficacy and safety of Resmetirom, a selective thyroid hormone receptor- β agonist, in the treatment of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **14**, 19790 (2024).
 91. Rojas, Á. *et al.* Emerging pharmacological treatment options for MAFLD. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **13**, 20420188221142452 (2022).
 92. Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M. F. & Marchesini, G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1941–1951 (2010).
 93. Armandi, A., Rosso, C., Caviglia, G. P. & Bugianesi, E. Insulin Resistance across the Spectrum of

- Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolites* **11**, (2021).
94. Meli, R., Mattace Raso, G. & Calignano, A. Role of innate immune response in non-alcoholic Fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. *Front. Immunol.* **5**, 177 (2014).
 95. Kitade, H., Chen, G., Ni, Y. & Ota, T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients* **9**, (2017).
 96. Khan, R. S., Bril, F., Cusi, K. & Newsome, P. N. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **70**, 711–724 (2019).
 97. Zhang, X.-Q., Xu, C.-F., Yu, C.-H., Chen, W.-X. & Li, Y.-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 1768–1776 (2014).
 98. Flessa, C.-M. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Evidence and Perspectives. *Curr. Obes. Rep.* **10**, 134–161 (2021).
 99. Lebeauvin, C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **69**, 927–947 (2018).
 100. Flessa, C.-M. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic (metabolic associated) fatty liver disease (NAFLD/MAFLD). *J. Cell. Biochem.* **123**, 1585–1606 (2022).
 101. Zhou, L., Shen, H., Li, X. & Wang, H. Endoplasmic reticulum stress in innate immune cells - a significant contribution to non-alcoholic fatty liver disease. *Front. Immunol.* **13**, 951406 (2022).
 102. Spinelli, J. B. & Haigis, M. C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* **20**, 745–754 (2018).
 103. Bratic, I. & Trifunovic, A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1797**, 961–967 (2010).
 104. Gao, A. W., Cantó, C. & Houtkooper, R. H. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol. Med.* **6**, 580–589 (2014).
 105. Bhatti, J. S., Bhatti, G. K. & Reddy, P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 1066–1077 (2017).
 106. Haas, R. H. Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology (Basel)*. **8**, 1–5 (2019).
 107. Arroyave-Ospina, J. C., Wu, Z., Geng, Y. & Moshage, H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **10**, (2021).
 108. Anastasopoulos, N.-A. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Cellular Senescence in the Pathogenesis of Metabolic Associated Fatty Liver Disease and Related Hepatocellular Carcinoma. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **12**, (2023).
 109. Angelico, F. *et al.* Review and expert opinion on MAFLD, oxidative stress and multifunctional management. *Drugs Context* **13**, (2024).
 110. Clare, K., Dillon, J. F. & Brennan, P. N. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis of MAFLD. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **10**, 939–946 (2022).
 111. Bukke, V. N., Moola, A., Serviddio, G., Vendemiale, G. & Bellanti, F. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated signaling and metabolic associated fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **28**, 6909–6921 (2022).
 112. Wasilewska, N. & Lebensztejn, D. M. Non-alcoholic fatty liver disease and lipotoxicity. *Clin. Exp. Hepatol.* **7**, 1–6 (2021).
 113. Roumans, K. H. M. *et al.* Hepatic saturated fatty acid fraction is associated with de novo lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Nat. Commun.* **11**, 1891 (2020).
 114. Branković, M. *et al.* Lipotoxicity as the Leading Cause of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).

115. Ma, K., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, L. & Li, M. Endoplasmic reticulum stress: bridging inflammation and obesity-associated adipose tissue. *Front. Immunol.* **15**, 1381227 (2024).
116. Luci, C., Bourinet, M., Leclère, P. S., Anty, R. & Gual, P. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 597648 (2020).
117. Lee, Y. A. & Friedman, S. L. Inflammatory and fibrotic mechanisms in NAFLD-Implications for new treatment strategies. *J. Intern. Med.* **291**, 11–31 (2022).
118. Tilg, H. & Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836–1846 (2010).
119. Czaja, M. J. JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 707–713 (2010).
120. Hirosumi, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333–336 (2002).
121. Cui, N. *et al.* Exercise inhibits JNK pathway activation and lipotoxicity via macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic fatty liver disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **13**, 961231 (2022).
122. Heida, A. *et al.* The hepatocyte IKK:NF- κ B axis promotes liver steatosis by stimulating de novo lipogenesis and cholesterol synthesis. *Mol. Metab.* **54**, 101349 (2021).
123. Tao, L., Ren, X., Zhai, W. & Chen, Z. Progress and Prospects of Non-Canonical NF- κ B Signaling Pathway in the Regulation of Liver Diseases. *Molecules* **27**, (2022).
124. Sun, W. *et al.* A network pharmacology approach: Inhibition of the NF- κ B signaling pathway contributes to the NASH preventative effect of an Oroxyllum indicum seed extract in oleic acid-stimulated HepG2 cells and high-fat diet-fed rats. *Phytomedicine* **88**, 153498 (2021).
125. Yu, L. *et al.* The NLRP3 Inflammasome in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis: Therapeutic Targets and Treatment. *Front. Pharmacol.* **13**, 780496 (2022).
126. Henao-Mejia, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **482**, 179–185 (2012).
127. Nagata, N., Chen, G., Xu, L. & Ando, H. An Update on the Chemokine System in the Development of NAFLD. *Medicina (Kaunas)*. **58**, (2022).
128. Morikawa, R. *et al.* Role of CC chemokine receptor 9 in the progression of murine and human non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **74**, 511–521 (2021).
129. Kazankov, K. *et al.* The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 145–159 (2019).
130. Zhang, W. & Lang, R. Macrophage metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
131. Barreby, E., Chen, P. & Aouadi, M. Macrophage functional diversity in NAFLD - more than inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **18**, 461–472 (2022).
132. Alkhouri, N., Carter-Kent, C. & Feldstein, A. E. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 201–212 (2011).
133. Kanda, T. *et al.* Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J. Gastroenterol.* **24**, 2661–2672 (2018).
134. Syn, W.-K., Choi, S. S. & Diehl, A. M. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* **13**, 565–580 (2009).
135. Potoupni, V. *et al.* Circulating tumor necrosis factor- α levels in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and a meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **36**, 3002–3014 (2021).
136. Ou, M.-Y., Zhang, H., Tan, P.-C., Zhou, S.-B. & Li, Q.-F. Adipose tissue aging: mechanisms and therapeutic implications. *Cell Death Dis.* **13**, 300 (2022).
137. Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and

- disease. *Cell* **185**, 419–446 (2022).
138. Luo, L. & Liu, M. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* **231**, R77–R99 (2016).
 139. Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S. & Frezza, E. E. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 1847–1856 (2009).
 140. Scheja, L. & Heeren, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 507–524 (2019).
 141. Sahu, B. & Bal, N. C. Adipokines from white adipose tissue in regulation of whole body energy homeostasis. *Biochimie* **204**, 92–107 (2023).
 142. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 1–16 (2016).
 143. Li, Y. *et al.* The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. *Front. Physiol.* **13**, (2022).
 144. Morigny, P., Boucher, J., Arner, P. & Langin, D. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat. Rev. Endocrinol.* **17**, 276–295 (2021).
 145. Cho, Y. K. *et al.* Lipid remodeling of adipose tissue in metabolic health and disease. *Exp. Mol. Med.* **55**, 1955–1973 (2023).
 146. Arner, P. & Langin, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 255–262 (2014).
 147. Sponton, C. H. & Kajimura, S. Multifaceted Roles of Beige Fat in Energy Homeostasis Beyond UCP1. *Endocrinology* **159**, 2545–2553 (2018).
 148. Pilkington, A.-C., Paz, H. A. & Wankhade, U. D. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity—Overview. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **12**, (2021).
 149. Sidossis, L. & Kajimura, S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **125**, 478–486 (2015).
 150. Lizcano, F. The beige adipocyte as a therapy for metabolic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 151. Maliszewska, K. & Kretowski, A. Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 152. Ravussin, E. & Galgani, J. E. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu. Rev. Nutr.* **31**, 33–47 (2011).
 153. Kajimura, S. & Saito, M. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 225–249 (2014).
 154. Carpentier, A. C. *et al.* Brown Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 447 (2018).
 155. Milton-Laskibar, I. *et al.* Effects of resveratrol and its derivative pterostilbene on brown adipose tissue thermogenic activation and on white adipose tissue browning process. *J. Physiol. Biochem.* **76**, 269–278 (2020).
 156. Wang, Z., Wang, Q. A., Liu, Y. & Jiang, L. Energy metabolism in brown adipose tissue. *FEBS J.* **288**, 3647–3662 (2021).
 157. Cuevas-Ramos, D., Mehta, R. & Aguilar-Salinas, C. A. Fibroblast Growth Factor 21 and Browning of White Adipose Tissue. *Front. Physiol.* **10**, 37 (2019).
 158. Harms, M. J. *et al.* Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* **19**, 593–604 (2014).
 159. Lasar, D. *et al.* Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Controls Mature Brown Adipocyte Inducibility through Glycerol Kinase. *Cell Rep.* **22**, 760–773 (2018).
 160. Gill, J. A. & La Merrill, M. A. An emerging role for epigenetic regulation of Pgc-1 α expression in environmentally stimulated brown adipose thermogenesis. *Environ. epigenetics* **3**, dvx009 (2017).
 161. Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* **48**, 1253–1262 (2007).
 162. Stern, J. H., Rutkowski, J. M. & Scherer, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* **23**, 770–

- 784 (2016).
163. Wang, X. *et al.* Recent Advances in Adipose Tissue Dysfunction and Its Role in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells* **10**, (2021).
 164. Martínez-Sánchez, N. There and Back Again: Leptin Actions in White Adipose Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 165. Holland, W. L. *et al.* An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab.* **17**, 790–797 (2013).
 166. Gamberi, T., Magherini, F., Modesti, A. & Fiaschi, T. Adiponectin Signaling Pathways in Liver Diseases. *Biomedicines* **6**, (2018).
 167. Combs, T. P. & Marliiss, E. B. Adiponectin signaling in the liver. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 137–147 (2014).
 168. Begum, M. *et al.* Adiponectin: A Promising Target for the Treatment of Diabetes and Its Complications. *Life (Basel, Switzerland)* **13**, (2023).
 169. Li, W. H. Targeting Ceramides and Adiponectin Receptors in the Islet of Langerhans for Treating Diabetes. *Molecules* **27**, (2022).
 170. Larsen, P. J. & Tennagels, N. On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Mol. Metab.* **3**, 252–260 (2014).
 171. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 633–643 (2017).
 172. Hardy, O. T., Czech, M. P. & Corvera, S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **19**, 81–87 (2012).
 173. Li, X. & Wang, H. Multiple organs involved in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Biosci.* **10**, 140 (2020).
 174. Donnelly, K. L. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).
 175. Eissing, L. *et al.* De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat. Commun.* **4**, 1528 (2013).
 176. Chao, H.-W., Chao, S.-W., Lin, H., Ku, H.-C. & Cheng, C.-F. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 177. Bedogni, G. *et al.* Relationship between fatty liver and glucose metabolism: a cross-sectional study in 571 obese children. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **22**, 120–126 (2012).
 178. Sunny, N. E., Parks, E. J., Browning, J. D. & Burgess, S. C. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* **14**, 804–810 (2011).
 179. Michalides, R. J. A. M. Cell cycle regulators: Mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. *J. Clin. Pathol.* **52**, 555–568 (1999).
 180. Jones, S. M. & Kazlauskas, A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett.* **490**, 110–116 (2001).
 181. Giacinti, C. & Giordano, A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220–5227 (2006).
 182. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
 183. Dyson, N. J. RB1: A prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev.* **30**, 1492–1502 (2016).
 184. Kent, L. N. & Leone, G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 326–338 (2019).
 185. Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* **35**, 461–478 (1998).
 186. Collins, K., Jacks, T. & Pavletich, N. P. The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2776–2778 (1997).

187. Balciunaite, E. *et al.* Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8166–8178 (2005).
188. Macaluso, M., Montanari, M. & Giordano, A. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* **25**, 5263–5267 (2006).
189. Wirt, S. E. & Sage, J. p107 in the public eye: an Rb understudy and more. *Cell Div.* **5**, 9 (2010).
190. Graña, X., Garriga, J. & Mayol, X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* **17**, 3365–3383 (1998).
191. Cobrinik, D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796–2809 (2005).
192. McClellan, K. A. *et al.* The p107/E2F pathway regulates fibroblast growth factor 2 responsiveness in neural precursor cells. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4701–4713 (2009).
193. Vanderluit, J. L. *et al.* p107 regulates neural precursor cells in the mammalian brain. *J. Cell Biol.* **166**, 853–863 (2004).
194. Ajioka, I. Coordination of proliferation and neuronal differentiation by the retinoblastoma protein family. *Dev. Growth Differ.* **56**, 324–334 (2014).
195. Yoshikawa, K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci. Res.* **37**, 1–14 (2000).
196. Greene, L. A., Biswas, S. C. & Liu, D. X. Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ.* **11**, 49–60 (2004).
197. Carnac, G. *et al.* The retinoblastoma-like protein p130 is involved in the determination of reserve cells in differentiating myoblasts. *Curr. Biol.* **10**, 543–546 (2000).
198. Parakati, R. & DiMario, J. X. Dynamic transcriptional regulatory complexes, including E2F4, p107, p130, and Sp1, control fibroblast growth factor receptor 1 gene expression during myogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 21284–21294 (2005).
199. Bhattacharya, D., Shah, V., Oresajo, O. & Scimè, A. p107 mediated mitochondrial function controls muscle stem cell proliferative fates. *Nat. Commun.* **12**, 5977 (2021).
200. Kurimchak, A. *et al.* Activation of p107 by fibroblast growth factor, which is essential for chondrocyte cell cycle exit, is mediated by the protein phosphatase 2A/B55 α holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3330–3342 (2013).
201. Kolupaeva, V., Laplantine, E. & Basilico, C. PP2A-mediated dephosphorylation of p107 plays a critical role in chondrocyte cell cycle arrest by FGF. *PLoS One* **3**, e3447 (2008).
202. Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* **4**, 263–273 (2006).
203. Classon, M., Kennedy, B. K., Mulloy, R. & Harlow, E. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10826–10831 (2000).
204. Ross, A. S., Tsang, R., Shewmake, K. & McGehee, R. E. J. Expression of p107 and p130 during human adipose-derived stem cell adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 927–931 (2008).
205. De Sousa, M., Porras, D. P., Perry, C. G. R., Seale, P. & Scimè, A. p107 is a crucial regulator for determining the adipocyte lineage fate choices of stem cells. *Stem Cells* **32**, 1323–1336 (2014).
206. Porras, D. P. *et al.* p107 Determines a Metabolic Checkpoint Required for Adipocyte Lineage Fates. *Stem Cells* **35**, 1378–1391 (2017).
207. Scimè, A. *et al.* Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1 α . *Cell Metab.* **2**, 283–295 (2005).
208. Huber, K., Mestres-Arenas, A., Fajas, L. & Leal-Esteban, L. C. The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism. *FEBS J.* **288**, 3813–3833 (2021).
209. Diehl, F. F., Sapp, K. M. & Vander Heiden, M. G. The bidirectional relationship between metabolism and cell cycle control. *Trends Cell Biol.* **34**, 136–149 (2024).
210. Fajas, L. Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Front. Oncol.* **3**, 4 (2013).

211. Aguilar, V. & Fajas, L. Cycling through metabolism. *EMBO Mol. Med.* **2**, 338–348 (2010).
212. Blanchet, E., Annicotte, J. S. & Fajas, L. Cell cycle regulators in the control of metabolism. *Cell Cycle* **8**, 4029–4031 (2009).
213. Cunarro, J. *et al.* p107 Deficiency Increases Energy Expenditure by Inducing Brown-Fat Thermogenesis and Browning of White Adipose Tissue. *Mol. Nutr. Food Res.* **63**, e1801096 (2019).
214. Bisteau, X., Caldez, M. J. & Kaldis, P. The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. *Cancers (Basel)*. **6**, 79–111 (2014).
215. LeCouter, J. E. *et al.* Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the Rb-related p107 gene. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7455–7465 (1998).
216. Gonzalez-Rellan, M. J. *et al.* O-GlcNAcylated p53 in the liver modulates hepatic glucose production. *Nat. Commun.* **12**, 5068 (2021).
217. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* **7**, 95–96 (2008).
218. Kitamura, T., Kahn, C. R. & Accili, D. Insulin receptor knockout mice. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 313–332 (2003).
219. Costabile, G. *et al.* Reduction of De Novo Lipogenesis Mediates Beneficial Effects of Isoenergetic Diets on Fatty Liver: Mechanistic Insights from the MEDEA Randomized Clinical Trial. *Nutrients* **14**, (2022).
220. Esler, W. P. & Cohen, D. E. Pharmacologic inhibition of lipogenesis for the treatment of NAFLD. *J. Hepatol.* **80**, 362–377 (2024).
221. Mateo-Marín, M. A. & Alves-Bezerra, M. Targeting acetyl-CoA carboxylases for the treatment of MASLD. *J. Lipid Res.* **65**, 100676 (2024).
222. Ye, Q. *et al.* Deficiency of gluconeogenic enzyme PCK1 promotes metabolic-associated fatty liver disease through PI3K/AKT/PDGFR axis activation in male mice. *Nat. Commun.* **14**, 1402 (2023).
223. Smith, U. & Kahn, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J. Intern. Med.* **280**, 465–475 (2016).
224. Lee, P. L., Jung, S. M. & Guertin, D. A. The Complex Roles of Mechanistic Target of Rapamycin in Adipocytes and Beyond. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 319–339 (2017).
225. Mao, Z. & Zhang, W. Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
226. Savova, M. S., Mihaylova, L. V., Tews, D., Wabitsch, M. & Georgiev, M. I. Targeting PI3K/AKT signaling pathway in obesity. *Biomed. Pharmacother.* **159**, 114244 (2023).
227. Ioannilli, L., Ciccarone, F. & Ciriolo, M. R. Adipose Tissue and FoxO1: Bridging Physiology and Mechanisms. *Cells* **9**, (2020).
228. Li, Y. *et al.* A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Prog. Lipid Res.* **66**, 42–49 (2017).
229. Lopez-Yus, M. *et al.* Identification of novel targets in adipose tissue involved in non-alcoholic fatty liver disease progression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **36**, e22429 (2022).
230. Holmer, M. *et al.* Associations between subcutaneous adipocyte hypertrophy and nonalcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* **12**, 20519 (2022).
231. Zhu, X., Zeng, C. & Yu, B. White adipose tissue in metabolic associated fatty liver disease. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **48**, 102336 (2024).
232. Knuth, C. M. *et al.* Subcutaneous white adipose tissue independently regulates burn-induced hypermetabolism via immune-adipose crosstalk. *Cell Rep.* **43**, 113584 (2024).
233. Hsiao, W.-Y. *et al.* The Lipid Handling Capacity of Subcutaneous Fat Is Programmed by mTORC2 during Development. *Cell Rep.* **33**, 108223 (2020).
234. Li, Q. & Spalding, K. L. The regulation of adipocyte growth in white adipose tissue. *Front. cell*

- Dev. Biol.* **10**, 1003219 (2022).
235. Verboven, K. *et al.* Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Sci. Rep.* **8**, 4677 (2018).
236. Hotta, Y. *et al.* Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* **150**, 4625–4633 (2009).
237. Mao, L., Lu, J., Hou, Y. & Nie, T. Directly targeting PRDM16 in thermogenic adipose tissue to treat obesity and its related metabolic diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **15**, 1458848 (2024).
238. Bartesaghi, S. *et al.* Subcutaneous delivery of FGF21 mRNA therapy reverses obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **28**, 500–513 (2022).
239. Kaisanlahti, A. & Glumoff, T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J. Physiol. Biochem.* **75**, 1–10 (2019).
240. Vacca, M. *et al.* An unbiased ranking of murine dietary models based on their proximity to human metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Nat. Metab.* **6**, 1178–1196 (2024).

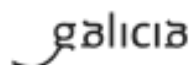
ANEXOS



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Avenida do Camello Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

AGACAL
Agencia Galega
de Calidade Alimentaria



MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "B" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "B"

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "B"

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

OVE EXAMINABLES
Verificación do Impacto Ambiental de Galicia

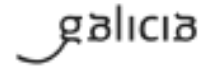


Xacobeo 2021



Avda. do Camiño Francés, 10, Baixo
15700 Santiago de Compostela
A Coruña

AGACAL
Axencia Galega
de Calidade Alimentaria



Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados o subministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN		
1.1 Apelidos/Apelidos/Surname DE OLIVEIRA DIZ		
1.2 Nome / Nombre / First names TADEU		IDNº(20) / Identity card number 55044864E
1.3 Categoría/Category/Category b	1.4 Especies/Especies/Species ROEDORES	1.5 Validación / Validación / Validation 11/06/2028
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
B482		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE		
1.1 Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 Baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
1.2 Teléfono / Teléfono / Telephone 981 546 654	1.3 Fax / Fax / Fax 981 546 651	1.4 Correo electrónico / Correo electrónico / Email formacion.crema@xunta.es
1.5 Data / Fecha / Date 28/12/2020	1.6 Lugar / Lugar / Place Santiago de Compostela	
3.7 Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature 3.8 Selo / Sello / Stamp Asde.: Manuel López Luaces Xefe de Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria (asinado dixitalmente)		

Asinado por: LUPEZ LUACES, MANUEL
 DNI nº 38114611 M

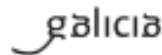
CVE: 100848705
 Verificación: https://sede.xunta.gal/cve





Avenida do Camiño Francés, 18, Edifício
27103 Santiago de Compostela
A Coruña

AGACAL
Academia Galega
de Caldos e Alimentos



MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA "C" REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS –ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1- Lexislación nacional (1 hora).
- 2- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).
- 3- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).
- 4- Coidado, saúde e manejo dos animais, nivel 1 (5 horas).
- 5- Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).
- 6- Métodos inocuos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "C"

- 1- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)
- 2- Procedementos mínimamente invasivos sen anestesia, nivel 1 (5 horas)
- 3- Procedementos mínimamente invasivos sen anestesia, nivel 2 (10 horas)
- 4- Anestesia para procedementos menores (5 horas)
- 5- Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)
- 6- Principios de cirurxía (5 horas)

MÓDULOS FUNDAMENTAIS O TRONCALES

- 1- Legislación nacional (1 hora).
- 2- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).
- 3- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).
- 4- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).
- 5- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).
- 6- Métodos inocuos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "C"

- 1- Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)
- 2- Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)
- 3- Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)
- 4- Anestesia para procedimientos menores (5 horas)
- 5- Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)
- 6- Principios de cirugía (5 horas)

OVE, CALDERINHAS
 Vendas de 10, 20 e 30 unidades de 600ml





Avenida do Camiño Francés, 10. Balco
15781 Santiago de Compostela
A Coruña

AGACAL
Axencia Galega
da Calidade Alimentaria



Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados o subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN		
11. Apelidos / Apellidos / Surnames DE OLIVEIRA DIZ		
12. Nome / Nombre / First name: TADEU		DNI / IDN / Identity card number: 55044864E
13. Categoría / Categoría / Category: "C"	14. Especies / Especies / Species: ROEDORES	15. Válido até / válido hasta / valid until: 11/06/2028
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
C515		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
11. Nome e endereço do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avenida do Camiño Francés, 10 balco 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
12. Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 654	13. Fax / Fax / Fax: 981 546 651	14. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: formacion.cmma@xunta.es
15. Data / Fecha / Date: 28/12/2020	16. Lugar / Lugar / Place: Santiago de Compostela	
17. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature: Asdo.: Manuel López Luaces Xefe de Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria (asinado dixitalmente)		

MANUEL LÓPEZ LUACES, MANUEL
 C/ Xela, 19, 1º. A
 15701 SANTIAGO DE COMPOSTELA

DNE, CANTONALVE
 Verificación de la autenticidad de la firma





En esta tesis doctoral se investiga las acciones de p107 sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa tanto en el hígado como en el tejido adiposo, además de discernir su influencia en la comunicación entre estos dos tejidos y los consecuentes efectos en el desarrollo de la obesidad y de la enfermedad hepática. Nuestros resultados han demostrado que, en concordancia con los modelos de obesidad, la inhibición de p107 produce una resistencia a la esteatosis inducida por dieta actuando sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa. En conclusión, este trabajo muestra un nuevo papel de p107 en el metabolismo tanto a nivel hepático como en la comunicación del hígado con el tejido adiposo blanco siendo un potencial candidato como nueva diana terapéutica para retrasar el MASLD y la progresión de la enfermedad hepática.